



Universidad Nacional de La Plata

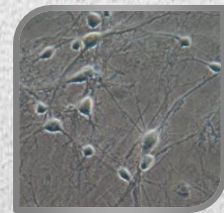
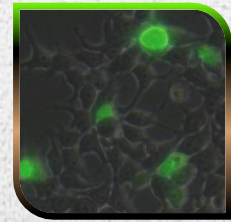
Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de Ciencias Biológicas

Estudio del efecto de dos modos de  
activación del receptor de melanocortinas  
tipo 4 sobre los canales de calcio operados  
por voltaje y su impacto sobre la actividad  
neuronal

---

Trabajo de Tesis Doctoral



Lic. Francina Agosti

**Directora:** Dra. Jesica Raingo

**Co-director:** Dr. Mario Perelló

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Electrofisiología, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

Estudio del efecto de dos modos de activación del  
receptor de melanocortinas tipo 4 sobre los canales de  
calcio operados por voltaje y su impacto sobre la  
actividad neuronal

Trabajo de Tesis Doctoral

**Lic. Francina Agosti**

# Agradecimientos

*A las entidades que financiaron los estudios de mi doctorado, CIC y CONICET.*

*A las autoridades del IMBICE que permitieron que desarrolle mis estudios en sus instalaciones.*

*A todos los integrantes del IMBICE por la buena disponibilidad en responder a las tareas que tuve que solicitar en estos años de trabajo, especialmente al Sector de Cultivos Celulares, gracias Daniel y Julieta por tanta ayuda.*

*A mi directora, Jesica Raingo, por haber confiado en mí y haberme enseñado a hacer investigación. Gracias por el tiempo aportado en instruirme, en cada explicación repetida mil veces, por estar todo el tiempo en cada detalle, por mostrarme el fascinante mundo de los canales de calcio.*

*A mi co-director, Mario Perelló, por aportar su lado fisiológico a este estudio, por su tiempo aportado y por su tranquilidad salvadora en momentos acertados.*

*A Silvia, por ser Silvia. Gracias por TODA la ayuda aportada, hasta el más mínimo detalle fue salvador.*

*A Javier por haber sido un compañero intachable. Por haberme ayudado en cada paso, por ser mi maestro preferido.*

*A los “nuevos” de EF, Román, Valen, Santi y Marix, por aportar su energía y buenos momentos en el laboratorio.*

*A los integrantes de NF por ayudarme en cada momento que los necesité, por su buena disponibilidad de siempre.*

*A todos los becarios del IMBICE que hicieron que los días en el instituto sean más alegres.*

*A mis queridos POs por estar siempre, por ser los mejores amigos que se puedan tener.*

*A Gero por su paciencia, por sacarme siempre una sonrisa y por creer en mi lado científico.*

*A Bren porque siempre está ahí para cualquier cosa que necesito, por ser la mejor hermana.*

*A mamá y papá porque dan todo y más por verme feliz. ¡Gracias, gracias, gracias!*

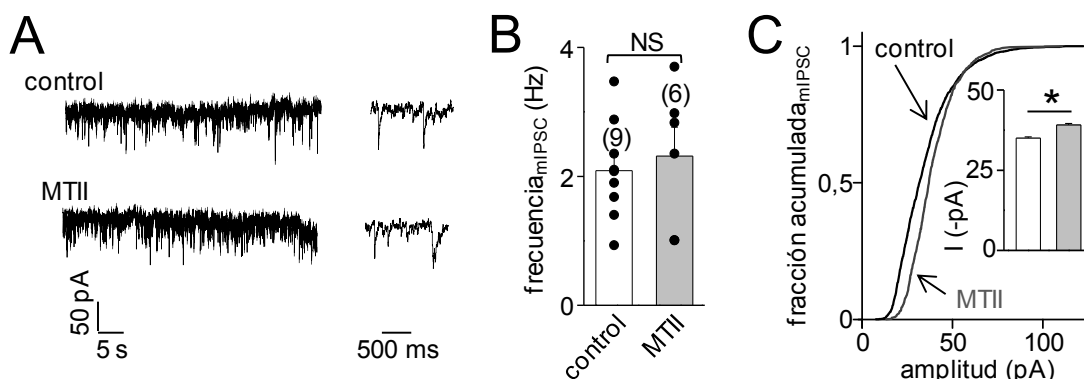


# Índice

## Contenido

Agradecimientos.....	2
Índice .....	4
Abreviaturas.....	6
Resumen .....	10
Introducción.....	12
Canales de calcio operados por voltaje .....	13
Receptor de melanocortinas tipo 4 .....	20
Objetivos .....	25
Objetivo General .....	26
Objetivos específicos .....	26
Materiales y Métodos.....	27
Resultados.....	45
Capítulo 1:.....	46
Impacto de la actividad constitutiva y de la dependiente de agonista del MC4R sobre la $I_{Ca}$ de los $Ca_v1.2$ , $Ca_v1.3$ , $Ca_v2.1$ y $Ca_v2.2$ .....	46
Obtención de los parámetros biofísicos de las $I_{Ca}$ de los distintos subtipos de $Ca_v$ .....	47
Efecto de la co-expresión del MC4R sobre la $I_{Ca}$ basal de cada subtipo de $Ca_v$ .....	49
Efecto de la actividad dependiente de agonista del MC4R sobre la $I_{Ca}$ de cada subtipo de $Ca_v$ .....	53
Efecto de la inhibición de los $Ca_v$ por la actividad del MC4R dependiente de agonista en cultivos primarios de amígdala .....	56
Efecto de la inhibición de los $Ca_v$ por la actividad constitutiva del MC4R en cultivos primarios de amígdala.....	60
Efecto de la actividad constitutiva del MC4R en la localización del $Ca_v2.1$ en neuronas de amígdala en cultivo. ....	61
Capítulo 2:.....	63
Impacto sobre la actividad neuronal por la inhibición de los $Ca_v$ mediada por la actividad del MC4R.....	63

Efecto en la liberación de neurotransmisores de neuronas de la amígdala por la activación del MC4R dependiente de agonista .....	64
--	----



**Figura 22. MTII no modifica la frecuencia y aumenta la amplitud de las mIPSC.** **A**, trazos representativos de registros de mIPSC a -80 mV en condición control y con la aplicación de MTII 250 nM en dos escalas distintas de tiempo. **B**, (izq) frecuencia promedio de las mIPSC en condiciones control y con la aplicación de MTII 250 nM. Entre paréntesis se indica el número de neuronas utilizadas para los registros. **C**, fracción acumulada de la amplitud y amplitud promedio de las mIPSC en condiciones control y con la aplicación de MTII 250 nM.

.....	67
Dependencia de la activación neuronal con la inhibición del $Ca_v2.2$ por la activación del MC4R dependiente de agonista .....	67
Dependencia de la activación neuronal con la des-inhibición de los $Ca_v1.2/Ca_v1.3$ por el bloqueo de la actividad constitutiva del MC4R.....	68
Capítulo 3:.....	71
Vías intracelulares involucradas en la inhibición de los $Ca_v$ por la activación del MC4R.....	71
Cascadas intracelulares involucradas en la inhibición del $Ca_v2.2$ por la actividad del MC4R dependiente de agonista .....	72
Cascadas intracelulares involucradas en la actividad constitutiva del MC4R que inhibe los $Ca_v$ .....	76
Inter-dependencia de las vías de señalización activadas por los dos modos de activación del MC4R .....	79
Discusión .....	83
Conclusiones.....	99
Bibliografía .....	102

## Abreviaturas

<b>Siglas</b>	<b>Significado</b>
°C	grados centígrados
ADN	ácido desoxiribonucleico
agaTx	$\omega$ agatoxina IVA
AgRP	<i>agouti-related protein</i> /proteína relacionada a agouti
AMP	<i>adenosine monophosphate</i> /adenosina monofosfato
AMPA	receptores del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
ARC	<i>arcuate nucleus</i> /núcleo arcuato
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BLA	amígdala basolateral
BMA	amígdala medial
Ca <sub>v</sub>	canal de calcio operado por voltaje
CeA	amígdala central
c-fos-IR	células inmunoreactivas para c-fos
ChTx	toxina del cólera
CNQX	6-ciano-7-nitro quinoxalina-2,3-diona
conoTx	$\omega$ conotoxina GVIA
CREB	<i>cyclic AMP response element-binding</i> /elemento de respuesta a AMP cíclico
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> /medio de cultivo Dulbecco modificado
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> / proteína verde fluorescente aumentado
EPSC	<i>excitatory post-synaptic current</i> /corriente post-sináptica excitatoria
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> /quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2
g	gramos
GABA	<i><math>\gamma</math>-aminobutyric acid</i> /ácido $\gamma$ -aminobutírico
GDP	<i>guanosine diphosphate</i> /guanosin difosfato
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> /receptor acoplado a proteína G
GTP	<i>guanosine triphosphate</i> /guanosin trifosfato
G $\Omega$	giga ohms
h	hora
HEK293t	<i>human embryonic kidney cells</i> /células de riñón de embriones humanos
hs	horas
I <sub>Ba</sub>	corriente de bario
I <sub>Ca</sub>	corriente de calcio



icv	intra-cerebro-ventricular
$I_{Na}$	corriente de sodio
IPSC	<i>inhibitory post-synaptic current</i> /corriente post-sináptica inhibitoria
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> /sitio de entrada interno para ribosoma
LB	Luria Bortani
LTP	<i>long term potentiation</i> /potenciación a largo plazo
MC4R	<i>melanocortin 4 receptor</i> /receptor de melanocortinas tipo 4
mEPSC	<i>mini excitatory post-synaptic current</i> /corriente post-sináptica excitatoria miniatura
mIPSC	<i>mini inhibitory post-synaptic current</i> /corriente post-sináptica inhibitoria miniatura
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
ms	milisegundos
MTII	melanotan II
mV	milivoltios
MΩ	mega ohms
nA	nanoamperes
ng	nanogramos
nife	nifedipina
NMDA	receptores de N-metil-D-aspartato
NS	no significativo
pA	picoamperes
PBS	solución salina de buffer fosfato
pF	picofaradios
PTx	toxina pertussis
PVN	<i>paraventricular nucleus</i> /núcleo paraventricular
r.p.m.	revoluciones por minuto
SFB	suero fetal bovino
TTX	tetrodotoxina
$\alpha$ -MSH	<i>alpha-melanocyte-stimulating hormone</i> /hormona estimulante de melanocitos
$\mu$ g	microgramos
$\mu$ l	microlitros

μs

microsegundos

## Resumen

Los canales de calcio operados por voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) se localizan a lo largo de toda la estructura de una neurona regulando la liberación de neurotransmisores, la expresión génica y el potencial de membrana, entre otras funciones. La actividad de los  $\text{Ca}_v$  es modulada por el voltaje, por la concentración del ion  $\text{Ca}^{+2}$  y por distintas proteínas, entre las que se destacan los receptores acoplados a proteína G (GPCR). En este trabajo de tesis estudiamos cómo un GPCR, el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R), modula la actividad de distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$ , y los posibles efectos en el control de la actividad neuronal. El MC4R se expresa en distintos núcleos del cerebro y cuando se activa por agonistas disminuye la ingesta de alimento, entre otras funciones, aunque los mecanismos moleculares que median su acción anorexigénica son aún desconocidos. El MC4R, presenta una característica peculiar conocida para algunos GPCRs: se encuentra activo en forma constitutiva aun en ausencia de sus agonistas. Pero una propiedad distintiva, conocida hasta el momento sólo para el sistema de melanocortinas, es que presenta un agonista inverso endógeno, la proteína relacionada a agouti (AgRP), que controla su actividad constitutiva. Además, AgRP funciona como antagonista del MC4R. Al estudiar el efecto de la actividad del MC4R sobre distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$ , nosotros encontramos que la activación del MC4R evocada por agonista inhibe la  $I_{\text{Ca}}$  de los  $\text{Ca}_v2.2$  en un sistema de expresión heteróloga y en neuronas de amígdala en cultivo. Esta inhibición señala a través de  $G_s$  y es independiente del voltaje. Encontramos que, a consecuencia de la inhibición de los  $\text{Ca}_v2.2$  por la activación del MC4R, disminuye la liberación de GABA en neuronas de la amígdala en cultivo y podría ser relevante en circuitos GABAérgicos de la amígdala controlando el tono inhibitorio en la amígdala central. En contraste, observamos que la actividad constitutiva del MC4R inhibe las  $I_{\text{Ca}}$  de los  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v2.1$  en un sistema de expresión heteróloga y en neuronas de amígdala en cultivo. Esta inhibición es ocluida por AgRP a largo plazo, depende de la cantidad de MC4R expresado, señala por la proteína  $G_{i/o}$  y depende de la fosforilación de la proteína ERK1/2. Estudios preliminares indican que la inhibición de los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$  podría disminuir la activación de la expresión génica de neuronas en cultivo, mientras que la inhibición de los  $\text{Ca}_v2.1$  disminuiría la cantidad de este  $\text{Ca}_v$  en las sinapsis de neuronas en cultivos primarios de amígdala. La inhibición diferencial de los distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$  por los dos modos de activación del MC4R contribuye a la regulación precisa de la actividad neuronal.

# Introducción

## Canales de calcio operados por voltaje

Los canales de calcio operados por voltaje ( $\text{Ca}_v$ ) son proteínas de membrana esenciales en células excitables. Los  $\text{Ca}_v$  se abren cuando la membrana plasmática de la célula se despolariza, permitiendo el ingreso selectivo del ion  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma celular. El  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a través de los  $\text{Ca}_v$  funciona como segundo mensajero para activar diversas funciones celulares, como la contracción muscular, la secreción de hormonas, la liberación de neurotransmisores (NT) y la expresión génica, entre otras funciones.

En vertebrados se conocen 10 genes que codifican para la subunidad principal de los  $\text{Ca}_v$  y se agrupan en 3 familias:  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  y  $\text{Ca}_v3$  (Ertel *et al.*, 2000). Muchos de ellos se expresan en neuronas del sistema nervioso central y periférico. La familia de los  $\text{Ca}_v1$  (clásicamente denominados “canales de calcio tipo L”), está compuesta por 4 subtipos,  $\text{Ca}_v1.1$ ,  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v1.4$ . Sólo dos de ellos se encuentran en neuronas,  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ , y se sub-localizan principalmente en somas y dendritas. Ambos subtipos son los encargados de iniciar la transcripción génica dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hell *et al.*, 1993; Westenbroek *et al.*, 1998; Dolmetsch *et al.*, 2001; Wheeler *et al.*, 2008; Brittain *et al.*, 2012) y pueden participar en la generación del potencial de acción (Liu *et al.*, 2014). Además, en algunos casos específicos intervienen en la regulación de la liberación de NT, como por ejemplo en la sinapsis entre neuronas eferentes olivococleares y las células ciliadas sensoriales cocleares del sistema auditivo (Zorrilla de San Martín *et al.*, 2010). Fuera del sistema nervioso los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  se expresan en células endócrinas donde regulan la liberación de hormonas (Gandini *et al.*, 2011), y los  $\text{Ca}_v1.2$  se expresan en el músculo cardíaco y controlan la excitación y contracción del corazón (Wang *et al.*, 2006). Por su parte, los  $\text{Ca}_v1.1$  se expresan en células musculares donde regulan la contracción del músculo esquelético (Hulme *et al.*, 2005), y los  $\text{Ca}_v1.4$  se expresan principalmente en células de la retina y funcionan como reguladores de la neurotransmisión en los conos fotorreceptores (Taylor & Morgans, 1998; Doering *et al.*, 2005). Los 4 subtipos de  $\text{Ca}_v1$  son sensibles a dihidropiridinas, de las cuales algunas funcionan como agonistas y otras como antagonistas (Peterson & Catterall, 2006). Por otro lado, la familia de los  $\text{Ca}_v2$  está compuesta por 3 subtipos ( $\text{Ca}_v2.1$ ,  $\text{Ca}_v2.2$  y  $\text{Ca}_v2.3$ ) que se encuentran expresados casi exclusivamente en neuronas. Se sub-localizan principalmente en las terminales nerviosas donde su apertura inicia la liberación de NT (Westenbroek *et al.*, 1992; Westenbroek *et al.*, 1995; Reid *et al.*, 2003). Los  $\text{Ca}_v2.1$  (clásicamente denominados “canales de calcio



tipo P/Q”) presentan una alta sensibilidad al bloqueo por  $\omega$ -agatoxina IVA (Sather *et al.*, 1993); los  $\text{Ca}_v2.2$  (canales de calcio tipo N) son específicamente bloqueados por  $\omega$ -conotoxina GVIA (Dubel *et al.*, 1992); y los  $\text{Ca}_v2.3$  clásicamente fueron denominados “tipo R” por ser resistentes a las toxinas previamente mencionadas, pero luego se encontró que la toxina SNX-482 los inhibe potentemente de manera semiselectiva (Bourinet *et al.*, 2001). Los  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2$  se clasifican como  $\text{Ca}_v$  activados por voltaje alto debido a que es necesaria una despolarización alta de la membrana plasmática para que puedan abrirse. Por último, la familia de los  $\text{Ca}_v3$  (clásicamente denominados “canales de calcio tipo T”), está compuesta por los  $\text{Ca}_v$  activados por voltaje bajo, ya que se abren a voltajes de membrana más hiperpolarizados que los  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2$ . Los  $\text{Ca}_v3$  comprenden 3 subtipos:  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  y  $\text{Ca}_v3.3$ . Los 3 subtipos se expresan en neuronas, principalmente en el soma y dendritas, y son inhibidos por bajas concentraciones de  $\text{Ni}^{+2}$  y por iones trivalentes como  $\text{La}^{+3}$  y  $\text{Y}^{+3}$  (Lacinova, 2011). Como poseen un potencial de activación bajo pueden regular la excitabilidad neuronal controlando el potencial de membrana, y, como consecuencia, la frecuencia de disparo de potenciales de acción de bajo umbral (Perez-Reyes, 2003; McKay *et al.*, 2006; Molineux *et al.*, 2006). Los  $\text{Ca}_v3$  también se localizan a lo largo del axón neuronal y participan en la propagación del potencial de acción (Francois *et al.*, 2015). En algunos casos particulares controlan también la neurosecreción (Carbone *et al.*, 2006; Giannippoli *et al.*, 2006; Weiss *et al.*, 2012). Además, el  $\text{Ca}_v3.1$  se expresa en células marcapasos del corazón controlando el potencial de membrana para así modular el ritmo cardíaco (Mesirca *et al.*, 2015).

En cuanto a su estructura, los  $\text{Ca}_v$  activados por voltaje alto son complejos heteroméricos formados por al menos 3 subunidades: una subunidad principal,  $\text{Ca}_v\alpha_1$ , y dos subunidades auxiliares,  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  y  $\text{Ca}_v\beta$ . La subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  es la subunidad responsable de la identidad de cada subtipo de  $\text{Ca}_v$ . Dependiendo de la similitud entre las secuencias aminoacídicas de las distintas  $\text{Ca}_v\alpha_1$ , los  $\text{Ca}_v$  se dividen en las 3 familias previamente mencionadas. Además, esta subunidad contiene el poro selectivo al  $\text{Ca}^{+2}$  y el sensor de voltaje. Está compuesta por 4 dominios homólogos, I, II, III y IV unidos entre sí por bucles citoplasmáticos denominados “I-II”, “II-III” y “III-IV”, y regiones N- y C-terminal también citoplasmáticas (Catterall, 2000). Cada dominio homólogo comprende 6 hélices transmembrana (S1-S6). La hélice S4 contiene aminoácidos cargados positivamente que detectan la despolarización de la membrana, y entre las hélices S4 y S5 está presente un bucle que ingresa al poro, por lo que se cree que es la sección del complejo proteico que confiere la selectividad a  $\text{Ca}^{+2}$ . Las distintas  $\text{Ca}_v\alpha_1$  tienen secuencias muy conservadas

correspondientes a los dominios homólogos, pero poseen regiones altamente variables en las regiones N- y C-terminal intracelulares que son las secciones que se asocian de manera selectiva con otras proteínas y contienen sitios de modulación por segundos mensajeros (Catterall, 2000). En cuanto a la subunidad auxiliar  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ , esta ha sido clásicamente relacionada con el aumento de la expresión de los  $\text{Ca}_v$  en la membrana (Canti *et al.*, 2005) y la sensibilidad al voltaje del complejo  $\text{Ca}_v$  (Felix *et al.*, 1997), pero recientemente se encontró que realiza una función independiente a la de la formación del complejo  $\text{Ca}_v$ : cumple roles fundamentales en la formación estructural de la sinapsis (Geisler *et al.*, 2015). La subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  es codificada por un único gen, traducida a una única proteína y luego, post-traduccionalmente, es clivada a  $\alpha_2$  (extracelular) y  $\delta$  (hélice transmembrana), que son re-ligadas por un puente disulfuro (De Jongh *et al.*, 1990). En mamíferos se encontraron 4 subtipos de esta subunidad,  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ - $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_4$ , de los cuales en neuronas se expresan tres de ellos,  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ - $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_3$  (Klugbauer *et al.*, 1999). La asociación de los distintos subtipos con la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  no le confiere propiedades significativamente distintas a las corrientes de  $\text{Ca}^{+2}$  ( $I_{\text{Ca}}$ ) de los  $\text{Ca}_v$ . La subunidad auxiliar  $\text{Ca}_v\beta$  también regula el tráfico de los  $\text{Ca}_v$  a la membrana plasmática (Bichet *et al.*, 2000) y modula la cinética de apertura e inactivación de los  $\text{Ca}_v$  (Colecraft *et al.*, 2002). Existen 4 subtipos de  $\text{Ca}_v\beta$ ,  $\text{Ca}_v\beta_1$ - $\text{Ca}_v\beta_4$ , y todas ellas se expresan en el cerebro (Dolphin, 2003). Además, cada subtipo de  $\text{Ca}_v\beta$  presenta distintas isoformas de *splicing* alternativo (mecanismos de corte y empalme del ARN mensajero) que al acoplarse con  $\text{Ca}_v\alpha_1$  le confieren distintas propiedades a la  $I_{\text{Ca}}$ . Por ejemplo, la subunidad  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  hace que la inactivación de la  $I_{\text{Ca}}$  de la mayoría de los  $\text{Ca}_v$  sea más lenta con respecto a  $\text{Ca}_v\beta_3$  (Suh *et al.*, 2012). Las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$  son proteínas citoplasmáticas a excepción del subtipo  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  que se encuentra palmitoilada, y como consecuencia, se halla anclada a la membrana (Suh *et al.*, 2012). Se ha encontrado una tercera subunidad auxiliar,  $\text{Ca}_v\gamma$ , pero hasta el momento no existen datos certeros sobre su funcionalidad. Además, no es necesaria su expresión en sistemas heterólogos para el funcionamiento del complejo  $\text{Ca}_v$ , mientras que las subunidades  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  y  $\text{Ca}_v\beta$ , si bien no son indispensables, son necesarias para obtener un nivel apreciable de  $I_{\text{Ca}}$  y una cinética de las  $I_{\text{Ca}}$  similar a la observada en células nativas (Singer *et al.*, 1991). Solo uno de los 8 subtipos de  $\text{Ca}_v\gamma$  encontrados en mamíferos no se expresa en neuronas, la  $\text{Ca}_v\gamma_1$ . En cuanto a la funcionalidad de esta subunidad auxiliar, algunos autores describieron que al menos  $\text{Ca}_v\gamma_2$  podría inhibir la  $I_{\text{Ca}}$  de los  $\text{Ca}_v2.2$  (Sandoval *et al.*, 2007).

### *Rol de los $Ca_v$ en la sinapsis*

La sinapsis es una estructura especializada donde ocurre la comunicación entre neuronas. Existen distintos tipos de sinapsis, siendo las más frecuentes las eléctricas (transmisión de un estímulo eléctrico) y las químicas (transmisión de intermediarios químicos). En una sinapsis química rápida cuando un potencial de acción arriba a la pre-sinapsis se produce la despolarización de este sector de la membrana celular activando el sensor de voltaje de los  $Ca_v$  localizados en la membrana de las terminales sinápticas. El cambio conformacional que se produce en los  $Ca_v$  permite la apertura del poro selectivo a  $Ca^{+2}$  generando el ingreso de este ion al citoplasma. El aumento del ion  $Ca^{+2}$  provoca la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática y la consecuente liberación de NT al espacio intersináptico (Katz, 1969). El  $Ca^{+2}$  que ingresa a través de los  $Ca_v$  desencadena la liberación de NT en menos de 0,1 ms (Sabatini & Regehr, 1999), por lo tanto, para que este proceso ocurra de manera tan rápida los  $Ca_v$  se organizan en nanodominios junto con las proteínas de la maquinaria sináptica (Stanley, 1993; Weber *et al.*, 2010). Estos nanodominios que se encuentran en las pre-sinapsis se denominan “zonas activas”, y allí se localizan vesículas sinápticas semi-fusionadas con la membrana plasmática listas para liberar los NT en respuesta a la entrada de  $Ca^{+2}$  (Sudhof, 2012). La organización de los nanodominios durante el desarrollo estructural de la neurona depende de la interacción de los  $Ca_v$  pre-sinápticos (principalmente  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ ) con el complejo de proteínas que comprende la maquinaria sináptica denominado “SNARE” (del inglés, *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Se encontró que los  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  presentan un sitio de interacción específico al SNARE, denominado synprint (del inglés, *synaptic protein interaction site*), localizado en el bucle citoplasmático II-III de la subunidad  $Ca_v\alpha_1$  (Sheng *et al.*, 1997). Los  $Ca_v2.3$  que contribuyen a la liberación de NT se encuentran en pocos tipos de sinapsis, y en algunas condiciones patológicas (Kaja *et al.*, 2006). Los  $Ca_v2.3$  no poseen un sitio synprint, sino que la interacción con la maquinaria sináptica parece depender de un anclaje a proteínas de andamio por un dominio específico localizado en la sección C-terminal de la subunidad  $Ca_v\alpha_1$  (Gurskaya *et al.*, 2012). Pero, ¿cómo el ingreso de  $Ca^{+2}$  produce la liberación de NT? El mecanismo parece ser complejo e involucrar un sensor de  $Ca^{+2}$  en la maquinaria de liberación. La proteína sinaptotagmina es señalada como el sensor de  $Ca^{+2}$  principal de la liberación rápida de NT. La sinaptotagmina se ubica en la interface entre las vesículas sinápticas y la membrana plasmática. La unión de  $Ca^{+2}$  en dominios específicos de esta proteína genera un cambio conformacional que desencadena un re-arreglo de los lípidos

de membrana, facilitando el inicio de la fusión de la vesícula sináptica y, como consecuencia, la liberación de NT al espacio intersináptico (Gundersen & Umbach, 2013). Una vez liberados, los NT se unen a receptores tipo canal iónico en la neurona post-sináptica. Estos receptores son canales iónicos que al activarse por ligando generan un flujo de iones que modifica el potencial de membrana. Cuando el NT liberado es GABA (del inglés, *γ-aminobutyric acid*), activa receptores GABA<sub>A</sub> en la membrana de la neurona post-sináptica. Estos receptores son canales iónicos que al activarse por ligando ingresan iones Cl<sup>-</sup> al citoplasma celular. Se genera una corriente negativa que produce una hiperpolarización de la membrana plasmática que llevará a una disminución de la frecuencia de disparo de potenciales de acción de la neurona. En cambio, cuando el NT liberado es glutamato, este se une a sus receptores específicos: receptores del ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) que al activarse ingresan cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>+2</sup> a la célula; y/o receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) que al activarse ingresan Ca<sup>+2</sup>. En ambos casos, se produce la despolarización de la membrana plasmática, que activa a los Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>1.3 post-sinápticos. El ingreso de Ca<sup>+2</sup> a través de estos Ca<sub>v</sub> activa la transcripción génica dependiente del elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB, del inglés *cyclic-AMP response element-binding*) (Zhang *et al.*, 2006). El aumento de Ca<sup>+2</sup> que desencadena la fosforilación de CREB es mucho menor al producido por la liberación de Ca<sup>+2</sup> de compartimientos intracelulares que desencadenan otros tipos de activación génica, por lo que se postula que los Ca<sub>v</sub>1 deben funcionar en microdominios donde las proteínas de la vía de CREB están en la cercanía de los Ca<sub>v</sub> y pueden detectar el aumento de Ca<sup>+2</sup> (Deisseroth *et al.*, 1996). En algunos casos específicos, la activación de receptores NMDA produce en el soma neuronal una potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) que involucra el incremento de respuesta de la neurona post-sináptica frente al mismo estímulo recibido desde la neurona pre-sináptica. Se postula que la mayor sensibilidad al estímulo puede deberse al aumento de actividad de los receptores post-sinápticos ubicados en la membrana plasmática o al incremento del número de receptores. Estos cambios neuronales se mantienen en el tiempo (en algunos casos hasta varios meses) y es necesaria la formación de nuevas proteínas para generarlos (Nguyen *et al.*, 1994). Se propone que los LTP generados por la activación de receptores NMDA podrían estar mediados por los Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>1.3, ya que activan la expresión génica, pudiendo generar re-arreglos proteicos que conllevan a la generación del mismo (Westenbroek *et al.*, 1990). Además, la despolarización de la membrana generada por la activación de receptores de

glutamato puede activar los  $\text{Ca}_v3$  que participan en la generación del potencial de acción y el mantenimiento del potencial de membrana (Perez-Reyes, 2003; McKay *et al.*, 2006; Molineux *et al.*, 2006). Una neurona posee receptores para diversos NT, los cuales pueden actuar en forma simultánea en el tiempo. Todas las señales recibidas son integradas y regulan el potencial de membrana. El valor de este potencial a nivel de la parte inicial del axón (cono axónico) es determinante para activar los canales que desencadenan el potencial de acción que se propaga a lo largo del axón modificando finalmente la liberación de NT específicos en las terminales sinápticas.

### *Modulación de los $\text{Ca}_v$*

Como mencioné previamente, los distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$  modulan importantes funciones celulares a lo largo de toda la estructura neuronal, por lo tanto, es necesaria una regulación fina de su actividad para poder controlar y coordinar todas las funciones que realizan.

Los  $\text{Ca}_v$ , tal como su nombre lo indica, son sensibles al voltaje por lo que el potencial de membrana modula su actividad. La despolarización de la membrana plasmática produce la apertura de los  $\text{Ca}_v$  provocando el ingreso de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula. Pero el exceso de  $\text{Ca}^{+2}$  produce efectos deletéreos y puede resultar en la muerte celular, por lo que existen mecanismos de control que inactivan los  $\text{Ca}_v$  luego de ser activados, entre ellos, la inactivación dependiente del voltaje y la inactivación dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ . Si bien el estímulo de un voltaje despolarizante produce la activación de los  $\text{Ca}_v$ , a potenciales altos los  $\text{Ca}_v$  son inactivados y disminuye el ingreso de  $\text{Ca}^{+2}$  cuando la despolarización se mantiene en el tiempo (Tuckwell, 2012). Por otro lado, el aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  inactiva los  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2$  de manera dependiente de calmodulina (Christel & Lee, 2012). Este efecto es evidente al comparar las corrientes utilizando  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Ba}^{+2}$  como ion de carga. En los registros donde se utiliza  $\text{Ba}^{+2}$ , además de obtenerse corrientes de mayor amplitud, la inactivación de la corriente es menor que cuando el ion utilizado es  $\text{Ca}^{+2}$  (Christel & Lee, 2012). Ambos mecanismos de inactivación evitan que el  $\text{Ca}_v$  continúe abierto por largo tiempo luego de recibir un estímulo, y sea sensible a la llegada de un nuevo estímulo despolarizante que requiera su activación para modular funciones celulares.

La actividad de los  $\text{Ca}_v$  también es modulada por la acción de proteínas. Distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$  son sensibles a la fosforilación por proteínas quinasa. Por ejemplo, es necesaria la fosforilación de los  $\text{Ca}_v1$  por la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) en su extremo C-terminal citoplasmático para que tengan la capacidad de activarse por voltaje (Armstrong & Eckert, 1987). Los  $\text{Ca}_v2.1$  y  $\text{Ca}_v2.2$  interaccionan con proteínas de la maquinaria sináptica. Se probó que la co-expresión de syntaxina 1 (proteína de la maquinaria sináptica) con  $\text{Ca}_v2.1$  o  $\text{Ca}_v2.2$  en células HEK293t disminuye la capacidad de los  $\text{Ca}_v$  para abrirse (Bezprozvanny *et al.*, 1995; Jarvis & Zamponi, 2001). Además, como mencioné previamente, los  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  y  $\text{Ca}_v3$  son modulados por sus subunidades auxiliares (Campiglio & Flucher, 2015). Hace cerca de 40 años, se descubrió que también los  $\text{Ca}_v$  son regulados por la actividad de receptores acoplados a proteína G (GPCR, del inglés *G protein-coupled receptor*) (Dunlap & Fischbach, 1978; 1981). La activación del GPCR genera el cambio de GDP por GTP en la proteína G liberando la subunidad  $G_{\beta\gamma}$  y permitiendo la activación de  $G_\alpha$  y la consecuente amplificación de la vía de señalización. El mecanismo clásico de inhibición (y probablemente el más estudiado) de los  $\text{Ca}_v$  involucra la interacción de  $G_{\beta\gamma}$  con los  $\text{Ca}_v2$  (Ikeda, 1996), generando una inhibición dependiente del voltaje, ya que una elevada despolarización de la membrana remueve la interacción de la subunidad con el  $\text{Ca}_v$  liberando la inhibición producida (Herlitze *et al.*, 1996; Jeong & Ikeda, 2000). Entonces, si bien esta modulación puede ocurrir en todas las neuronas que expresen el  $\text{Ca}_v$  y GPCR involucrados, será más importante en neuronas con poca actividad. Por otro lado, los GPCRs pueden inhibir los  $\text{Ca}_v$  mediante una serie heterogénea de mecanismos que involucran la subunidad  $G_\alpha$  y que resultan en una inhibición independiente del voltaje. Las vías de modulación de los  $\text{Ca}_v$  a través de  $G_\alpha$  incluyen cascadas de segundos mensajeros, por lo que se espera que exista una amplificación de la señal y, a diferencia de la inhibición por  $G_{\beta\gamma}$ , no son removidas por voltaje. En general, este tipo de inhibiciones independientes del voltaje comprenden fosforilaciones/desfosforilaciones de los  $\text{Ca}_v$ . Por ejemplo, la activación del receptor de dopamina D1 que se acopla a  $G_s$  activa PKA y fosforila la proteína fosfatasa 1. Esta última desfosforila residuos de los  $\text{Ca}_v2.1$  y  $\text{Ca}_v2.2$  inhibiendo sus  $I_{Ca}$  (Surmeier *et al.*, 1995). El receptor muscarínico M1 también inhibe de manera independiente del voltaje a los  $\text{Ca}_v2.2$  a través de  $G_q$ , pero esta inhibición requiere además de la subunidad  $G_{\beta\gamma}$  (Kammermeier *et al.*, 2000). Estas inhibiciones independientes del voltaje perduran hasta el cese de la activación del GPCR y pueden actuar enzimas quinasa o fosfatasa que recuperen la actividad normal de los  $\text{Ca}_v$ . Además de la distinta sensibilidad de cada  $\text{Ca}_v$  a la



activación de un GPCR, cada sub-tipo particular de  $Ca_v$  realiza *splicing* alternativo y, al menos para el  $Ca_v2.2$  se ha demostrado que las isoformas resultantes son diferencialmente sensibles a vías de proteína G (Raingo *et al.*, 2007).

Por todo lo descripto hasta aquí, es claro que los  $Ca_v$  neuronales son importantes blancos para regular la actividad neuronal. En este trabajo de tesis estudiamos si distintos subtipos de  $Ca_v$ , son modulados por la actividad de un GPCR, el receptor de melanocortinas tipo 4 (MC4R), y si esta modulación implica cambios en la actividad neuronal. El MC4R se expresa en el cerebro y, entre otras funciones, regula la ingesta de alimento. La activación del MC4R involucra el cese de la ingesta de alimento por lo que ha sido siempre seriamente considerado como un blanco farmacológico para tratar la obesidad en humanos. Los mecanismos moleculares por los cuales el MC4R regula la actividad neuronal para ejercer sus efectos anorexigénicos son aun desconocidos. Para que dicho sistema sea correctamente utilizado como una alternativa terapéutica es fundamental conocer en detalle los mecanismos celulares a través de los cuales regula las diferentes funciones neuronales. Nosotros, en este trabajo de tesis proponemos como mediadores de la actividad del MC4R a distintos  $Ca_v$ , dos pre-sinápticos,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ , a través de los cuales podría modular la liberación de NT; y dos post-sinápticos,  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ , por los cuales podría modular mecanismos somáticos, como la expresión génica, para modular la actividad neuronal.

## Receptor de melanocortinas tipo 4

Los receptores de melanocortinas son 5: MC1-5R. Solo dos de ellos se encuentran expresados en el sistema nervioso central, el MC3R y el MC4R (Cone, 2006). El MC4R se localiza en varios núcleos del cerebro y modula diversas funciones fisiológicas, como control de la memoria (Machado *et al.*, 2010), el estrés (Yamano *et al.*, 2004), la ansiedad y la depresión (Chaki & Okuyama, 2005), la función sexual (Van der Ploeg *et al.*, 2002) y la ingesta de alimento (Balthasar *et al.*, 2005). Los agonistas del MC4R son los péptidos derivados de la prohormona POMC (pro-opio melanocortinas). POMC se sintetiza en un grupo de neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) y en la misma neurona ocurren los procesos post-traduccionales para generar distintos péptidos: endorfinas y

melanocortinas (Tranchand-Bunel *et al.*, 1987; Mountjoy, 2010). Los distintos péptidos generados poseen una secuencia de Phe-Arg-Trp característica de agonistas de melanocortinas, por lo tanto, pueden poseer un importante rol fisiológico en las vías de señalización centrales de los receptores de melanocortinas (Abbott *et al.*, 2000; Al-Barazanji *et al.*, 2001; Millington *et al.*, 2001). De todos los péptidos derivados de POMC,  $\alpha$ -MSH (del inglés, *alpha-melanocyte stimulating hormone*), es el principal agonista del MC4R (Mountjoy, 2010). Si bien no se conocen en detalle los mecanismos moleculares que median la acción del MC4R, se sabe que su activación por agonistas produce activación neuronal: inyecciones intra-cerebro-ventriculares (icv) de RO27-3225 (un agonista sintético específico del MC4R) activan neuronas de la amígdala (Benoit *et al.*, 2000); el MTII despolariza neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) en rebanadas de cerebro (Liu *et al.*, 2003), y  $\alpha$ -MSH aumenta la frecuencia de disparo de neuronas del PVN (Ghamari-Langroudi *et al.*, 2011); además, la activación del MC4R por agonista aumenta el  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular *in vitro* (Mountjoy *et al.*, 2001).

El MC4R, al igual que algunos GPCR, presenta actividad constitutiva, es decir que está parcialmente activado en ausencia de sus ligandos (Srinivasan *et al.*, 2004). Pero una característica distintiva del sistema de regulación de su actividad es la existencia de un péptido endógeno denominado AgRP (del inglés, *agouti-related protein*) que actúa como agonista inverso del MC4R. Un agonista inverso es un ligando que modula negativamente la actividad constitutiva del receptor, por lo tanto, amplía el rango de modulación de la actividad del receptor. El AgRP además funciona como antagonista de MC3R y MC4R. Este péptido se sintetiza en neuronas del ARC diferentes a las que producen POMC. Hasta el momento solo se conocen agonistas inversos endógenos de dos GPCRs, del MC1R (agouti) y del MC4R (AgRP), lo que conduce a pensar que la actividad constitutiva de estos receptores podría tener un rol fisiológico importante (Adan, 2006). En soporte de esta idea, se vio que mutaciones en el gen del MC4R que eliminan la actividad constitutiva producen obesidad en humanos, demostrando su importancia para el mantenimiento del balance energético del organismo (Ho & MacKenzie, 1999; Lubrano-Berthelier *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2004). Es importante destacar que existen zonas del cerebro donde MC4R se encuentra expresado y no llegan inervaciones de neuronas que producen  $\alpha$ -MSH pero si de AgRP (Adan & Kas, 2003). Aquí, solo la actividad constitutiva del MC4R sería relevante debido a que no se puede activar de manera dependiente de ligando. Por su parte, el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) expresa MC4R sin recibir inervaciones de AgRP ni de  $\alpha$ -MSH (Haskell-

Luevano *et al.*, 1999), y la expresión del receptor en el VMH varía frente a situaciones fisiológicas extremas, aumentando su expresión en anorexia. Además, los efectos orexigénicos provocados por inyecciones icv de AgRP se extienden mucho más en el tiempo que los efectos anorexigénicos de inyecciones icv de agonistas del MC4R (Hagan *et al.*, 2000). Todas estas características de la relación MC4R-AgRP, conducen a pensar que el sistema de melanocortinas tiene una fina regulación endógena para su correcto funcionamiento, no solo por sus agonistas, sino además regulando el nivel de actividad constitutiva por su agonista inverso y el nivel de expresión del MC4R.

Históricamente, la función y regulación de la actividad del MC4R se estudió principalmente en el hipotálamo por su rol en la modulación de la ingesta de alimento (Cone, 2006). Nuevas evidencias demostraron que otras estructuras del cerebro implicadas en la regulación de la ingesta de alimento, como la amígdala, también expresan el MC4R en elevadas cantidades (Kishi *et al.*, 2003; Gelez *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha descrito que la expresión del MC4R exclusivamente en el hipotálamo y en la amígdala es suficiente para regular la ingesta de alimento en ratones (Balthasar *et al.*, 2005). Además, se demostró que lesiones en la amígdala provocan obesidad en ratas (King, 2006) y que inyecciones del agonista sintético específico de MC3R y MC4R melanotan II (MTII) específicamente en la amígdala disminuyen la ingesta de alimento en ratas (Boghossian *et al.*, 2010). Entonces, la amígdala es un núcleo importante en el cual los efectos del MC4R producen la modulación de la ingesta de alimento.

El MC4R puede sub-localizarse tanto en la pre- como en la post-sinapsis. Se encontró que regula mecanismos pre-sinápticos en neuronas que inervan el PVN (Cowley *et al.*, 1999), el hipotálamo medial (Fu & van den Pol, 2008) y el núcleo del tracto solitario (NTS) (Wan *et al.*, 2008). Y se describió una localización post-sináptica del MC4R mediando mecanismos celulares post-sinápticos en neuronas del PVN (Liu *et al.*, 2003; Ghamari-Langroudi *et al.*, 2011). Entonces, el MC4R puede modular la actividad neuronal desde la pre- o la post-sinapsis.

### *Vías de señalización intracelular del MC4R*

En la mayoría de los trabajos científicos realizados se describe al MC4R como un GPCR acoplado a la proteína G<sub>s</sub>. En estos trabajos evalúan el grado de actividad del

MC4R (dependiente de agonista y constitutiva) midiendo el nivel de activación de las vías de señalización activadas tradicionalmente por  $G_s$ , como la acumulación del AMP cíclico citoplasmático (Gantz *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2003; Shinyama *et al.*, 2003). Pero también, en otros trabajos se encontró que el MC4R puede señalizar a través de  $G_q$  y  $G_{i/o}$  en distintos tipos celulares (Chai *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 2006; Buch *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que el MC4R posee una gran promiscuidad al acople de distintas proteínas G. Es posible que el MC4R posea distintos estados conformacionales activados que permiten la interacción con distintas proteínas G (Breit *et al.*, 2011). Esto ha sido recientemente descrito para varios otros GPCRs, aportando a la noción actual de que muchos GPCRs actúan en forma parcial (activando alguna/s vías intracelulares) dependiendo de su modo de activación, constitutiva o mediada por agonistas, del ligando involucrado, y del tipo celular donde se encuentran expresados (Alonso *et al.*, 2015; M'Kadmi *et al.*, 2015). En relación a esto, mutaciones puntuales del MC4R llevan a la pérdida de una vía de señalización mientras otras se mantienen inalteradas. La mutación R18C genera un importante descenso de la actividad constitutiva del MC4R a través de  $G_s$  comparada con el receptor salvaje, pero mantiene la activación por agonista dependiente de  $G_s$  funcionando al mismo nivel que el receptor salvaje (Srinivasan *et al.*, 2004). Además, el mutante D90N mantiene inactiva la activación de  $G_s$ , pero activa la señalización a través de  $G_{i/o}$  (Buch *et al.*, 2009). Estos datos sugieren que el MC4R puede tener agonistas parciales que activen una vía de señalización y mantengan inactivadas otras. Esto sería un mecanismo importante a tener en cuenta para la generación de agonistas/antagonistas sintéticos que puedan utilizarse como fármacos para tratar clínicamente desórdenes alimenticios evitando efectos secundarios que sean desencadenados por alguna de las vías de señalización que puede activar el MC4R (M'Kadmi *et al.*, 2015).

En otros trabajos científicos, también se mostró que la activación del MC4R activa una cascada de señalización de proteínas quinasa (MAPK, de sus siglas en inglés para *mitogen-activated protein kinase*) conllevando a la fosforilación de la proteína quinasa regulada por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2, del inglés, *extracellular signal-regulated kinase*) (Berthoud *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2006). La activación de ERK1/2 dependiente del MC4R se ha descrito tanto para su actividad constitutiva, como para la dependiente de agonista y estas vías dependen de distintas proteínas G dependiendo del agonista utilizado o el tipo celular donde es estudiado este efecto (Vongs *et al.*, 2004; Berthoud *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2006; Mo & Tao, 2013).

Nosotros, en este trabajo de tesis estudiamos si los mecanismos intracelulares utilizados por el MC4R para modular la actividad neuronal dependen de la regulación de los  $\text{Ca}_v$  post-sinápticos  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ ; y/o de los  $\text{Ca}_v$  pre-sinápticos,  $\text{Ca}_v2.1$  y  $\text{Ca}_v2.2$ ; y las vías intracelulares de señalización involucradas.

## Objetivos



## Objetivo General

En este trabajo de tesis proponemos determinar el impacto de la actividad constitutiva y dependiente de agonista del MC4R sobre  $Ca_v$  pre- y post-sinápticos y su posible efecto sobre la actividad neuronal

## Objetivos específicos

1- Estudiar el efecto de la activación del MC4R por agonista y la actividad constitutiva sobre las  $I_{Ca}$  de los distintos subtipos de  $Ca_v$  post-sinápticos:  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ ; y pre-sinápticos:  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$  en un sistema de expresión heteróloga y en neuronas de amígdala en cultivo.

2- Determinar los cambios en la actividad neuronal ocasionada por la modulación de los  $Ca_v$  mediada por la actividad del MC4R en neuronas de amígdala.

3- Determinar la vía de señalización de la actividad del MC4R que modula a los distintos subtipos de  $Ca_v$  en un sistema de expresión heteróloga.

## Materiales y Métodos

## 1. Modelos experimentales

### 1.1. Línea celular HEK293t

Como modelo de estudio se utilizó una línea celular eucariota de mamífero derivada de la línea HEK293 (del inglés, *human embryonic kidney cells*), la línea HEK293t. Esta línea celular altamente transfectable contiene el antígeno T del virus SV40 (del inglés, *simian vacuolating virus 40*) que permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación del SV40. De este modo, se incrementa el número de copias de los plásmidos transfectados generándose un incremento de la expresión de los productos proteicos codificados por los genes de interés.

### 1.2. Ratones salvajes

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL6/J en edad fértil provenientes del sector de bioterio del IMBICE.

Todos los procedimientos llevados a cabo con animales se realizaron minimizando al máximo el sufrimiento del animal y bajo la aprobación del Comité de Ética del IMBICE.

Los animales se mantuvieron en el cuarto de cría en el sector de bioterio del IMBICE con ciclos fijos de luz/oscuridad de 12 hs y con temperatura ambiental controlada (23°C). Fueron alimentados con acceso *ad libitum* de agua y alimento comercial completo para roedores (GEPSA, Grupo Pilar, Buenos Aires, Argentina).

Para realizar cultivos primarios neuronales se programaron ciclos de apareamiento de tres días consecutivos, colocando en una misma jaula tres animales hembras y un macho. Posteriormente se realizó el seguimiento de peso corporal de las hembras para determinar la preñez. A los 16 días luego del apareamiento, cuando los embriones tienen 16-18 días de gestación, se procedió a realizar la cesárea de la hembra preñada.

Para experimentos *in vivo* se utilizaron ratones macho salvaje de 2-3 meses de edad.

## 2. Cultivos celulares

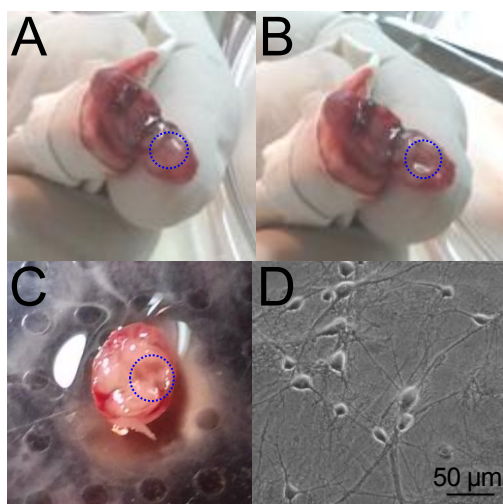
### 2.1. Cultivos de la línea celular HEK293t

Los cultivos de células HEK293t se mantuvieron rutinariamente en frascos de cultivo celular estériles de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (NEST Biotechnology Co., cat#707003, Jiangsu, China) con medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM, del inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium*, Laboratorios Microvet, cat#P3030, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, cat#1650-01, Internegocios, Mercedes, Buenos Aires, Argentina) a 37 °C en una atmósfera con 5 % CO<sub>2</sub> y humedad controlada. Se realizaron subcultivos en placas de Petri de poliestireno de 35 mm de diámetro (NEST, cat# 706001). Para ello, cuando las células alcanzaron una confluencia entre el 80 y 90 %, se retiró el medio de cultivo de los frascos, se agregaron 3 ml de solución cítrico salina (KCl 10 g/L y citrato de sodio 44 g/l en agua) estéril y se incubaron durante 10 min a 37 °C. Luego se dispersaron las células mecánicamente con pipetas de vidrio de 5 ml y se agregaron 0,3 ml de la suspensión celular a cada placa de cultivo para obtener una confluencia aproximada del 70 % a las 24 hs, en volumen final de 2 ml con DMEM + 10 % SFB. Estas placas fueron incubadas en iguales condiciones a las descriptas para los frascos de cultivo.

## 2.2. Cultivos primarios de neuronas de ratón

Se utilizaron ratones salvajes para realizar cultivos primarios enriquecidos de neuronas de amígdala en el día embrionario 16-18. Se anestesiaron las ratonas preñadas con hidrato de cloral (500 mg/kg), se removieron los embriones y se colocaron en una solución de Hank estéril (Microvet, cat#L2005-500). Luego, en una cabina de flujo laminar horizontal se extrajeron los cerebros de los embriones. Los cerebros se expusieron del lado ventral y se removió el hipotálamo con pinzas para dejar libre el acceso a la amígdala (figura 1A y B). Luego se tomó con una pinza curvada la zona compuesta principalmente por la amígdala: ~1 mm de profundidad de la superficie ventral del lóbulo temporal a la línea media. El quiasma óptico y el borde rostral de los cuerpos mamilares se usaron como límites rostral y caudal, respectivamente (figura 1C). El tejido se colocó en solución de Hank estéril enfriada en hielo, luego de dos lavados se procedió con la digestión enzimática del tejido. Se incubó a 37 °C por 20 min en solución de Hank con tripsina 0,25 mg/ml (Microvet, cat#L2700-100) y desoxyribonucleasa I de páncreas bovino 0,28 mg/ml (Sigma Aldrich, cat#D5025, Missouri, Estados Unidos), luego se agregaron 300 µl de SFB para detener la digestión. Se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante para eliminar las enzimas de digestión. Se

agregó 1 ml de solución de Hank y se disoció mecánicamente el tejido usando en primer lugar pipetas Pasteur de vidrio y luego agujas hipodérmicas con diámetros de tamaño decreciente (20G y 22G). Posteriormente se contaron células vivas en una cámara de Neubauer distinguidas por su falta de tinción con Azul de Tripán. Se sembraron 50.000 células en vidrios de 12 mm de diámetro (Deckaglas, cat#01105209, Sondheim, Alemania) previamente tratados con poli-L-lisina (Sigma Aldrich, cat#P8920) en placas estériles de 24 pocillos de 15 mm de diámetro (Jet Biofil, cat#TCP001024, Guangdong, China). El tratamiento de los vidrios con poli-L-lisina es necesario para generar una matriz donde crezcan las neuronas. El procedimiento consiste en colocar poli-L-lisina por 30 min sobre los vidrios, luego se retira la poli-L-lisina y se realizan dos lavados con agua estéril. Los vidrios se dejan secar y luego se colocan las células sobre ellos. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con 5 % CO<sub>2</sub> con 0,5 ml de DMEM / F12 1:1 suplementado con 10 % de SFB, 0,25 % de glucosa, 2 mM de glutamina (GIBCO, cat#21051-016, Massachusetts, Estados Unidos), 3,3 µg/ml de insulina (Nordisk Pharm Ind, Inc, Carolina del Norte, Estados Unidos), 5 U/ml de penicilina sódica (Richet, Buenos Aires, Argentina), 5 µg/ml de estreptomycin (Richet, cat#NC), 40 µg/ml de sulfato de gentamicina (Richet), 1 % de solución de vitamina (Microvet, cat#L2112-100) y suplemento B27 (1:50) (GIBCO, cat#17504-044). Al cuarto día de cultivo se reemplazó la mitad del medio con medio con citosina-β-D-arabinofuranosida (Sigma Aldrich, cat#C1768) alcanzando una concentración final de 5 µM para inhibir la proliferación de células de la glía.



**Figura 1. Realización de cultivos primarios neuronales de amígdala.** **A**, embrión de ratón de entre 16 y 18 días de gestación con el cerebro expuesto de manera dorsal. El círculo de puntos azules indica la zona comprendida por el hipotálamo. **B**, mismo cerebro que en A con el hipotálamo retirado. El círculo de puntos azules indica la zona donde el hipotálamo fue extraído. **C**, mismo cerebro que en A y B con la sección de la amígdala izquierda extraída. El círculo de puntos azules indica la sección del cerebro donde fue retirada la amígdala izquierda. **D**, microfotografía de cultivo primario neuronal de amígdala de 6 días.

### 3. Expresión heteróloga

#### 3.1. Transfecciones transitorias de células HEK293t

Se realizaron transfecciones transitorias de células HEK293t con una confluencia entre un 70 y 80 % utilizando el método de liposomas catiónicos con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat#11668-019, Massachusetts, Estados Unidos) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Los plásmidos de los GPCR utilizados fueron MC3R y MC4R, ambos contenidos en el vector L307. Este vector contiene un cassette de expresión bajo el control del promotor de ubiquitina C, el mismo posee un sitio de entrada para ribosoma interno (IRES, del inglés, *internal ribosome entry site*) aguas abajo del gen del GPCR y aguas arriba de la secuencia codificante para eGFP (del inglés, *enhanced green fluorescent protein*) permitiendo idealmente la expresión de eGFP cada vez que se exprese el GPCR. Los plásmidos fueron contruidos a partir de plásmidos comerciales (Open Biosystems, cat# MMM1013-99827302 y cat# MMM1013-99829006, Huntsville, Alabama, Estados Unidos) con la ayuda del Dr. Mikhail Khvotchev (del laboratorio del Dr. Ege Kavalali, UT Southwestern Medical Center). Los plásmidos de las subunidades  $Ca_v\alpha_1$  utilizados fueron:  $Ca_v1.2$  (número de acceso al GenBank: #AY728090),  $Ca_v1.3$  (número de acceso al GenBank: #AF370009),  $Ca_v2.1$  (número de acceso al GenBank: #AY714490),  $Ca_v2.2e37b$  (número de acceso al GenBank: #AF055477),  $Ca_v2.2e37a$  (número de acceso al GenBank: #AY211500),  $Ca_v2.2e37b+18a$  (número de acceso al GenBank: #AF222337); los de las subunidades auxiliares de los  $Ca_v$ :  $Ca_v\alpha_2\delta_1$  (número de acceso al GenBank: #AF286488),  $Ca_v\beta_3$  (número de acceso al GenBank: #M88751). En algunos experimentos se co-transfectaron además el plásmido de RGS2 contenido en un vector pCI (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), y un mutante del MC4R, el MC4R-R18C contenido en el vector L-307. Se transfectaron proporciones molares iguales de cada plásmido excepto en algunos experimentos donde se utilizaron cantidades decrecientes del plásmidos conteniendo el MC4R.

Los plásmidos de los  $Ca_v$  fueron provistos gentilmente por la Dra. Diane Lipscombe (Brown University, Estados Unidos).

### 4. Protocolos de biología molecular



#### 4.1. Competencia bacteriana

Se utilizaron las cepas JM109 y DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* dado que carecen de los genes codificantes de la endonucleasa A y recombinasa A, por lo que garantizan estabilidad y calidad de las preparaciones de plásmidos obtenidas a partir de las mismas.

Para la competencia bacteriana se utilizó el método de Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan & Meselson, 1983). Para ello, con un ansa se realizaron estrías de bacterias (de un stock conservado a -80 °C en glicerol) en una placa de Petri estéril con medio Luria Bertani-agar al 1,5% (LB: 1 g triptona, 0,5 g extracto de levadura, 1 g NaCl, 10 ml agua destilada, 1,5 g agar) y se incubó durante toda la noche a 37 °C. A la mañana siguiente se transfirió una colonia de 2-3 mm de diámetro a 10 ml de medio LB sin antibiótico y se incubó hasta aproximadamente las 18 hs del mismo día a 37 °C con agitación. Entonces, se inocularon tres Erlenmeyers conteniendo 100 ml de medio LB sin antibiótico con 4 ml, 1,6 ml y 0,8 ml del cultivo bacteriano y se incubaron a 18 °C con agitación constante hasta que a la mañana siguiente alguno alcance una densidad óptica de 0,55 a 600 nm que indica fase exponencial de crecimiento. Luego se enfrió el cultivo de bacterias en hielo durante 10 min y se lo centrifugó a 4000 r.p.m. por 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 32 ml de solución de competencia enfriada en hielo, y posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 8 ml de solución de competencia fría, se adicionaron 0,64 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se incubó en hielo por 10 min. Por último, la suspensión de bacterias se alicuotó de a 200  $\mu$ l en tubos estériles previamente enfriados en hielo, y se conservaron inmediatamente a -80 °C hasta su uso.

#### 4.2. Transformación de bacterias competentes

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook (Sambrook, 2001). Para ello se adicionaron aproximadamente 100 ng de ADN plasmídico a 200  $\mu$ l de suspensión de bacterias competentes, y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. Luego, el tubo se transfirió a un baño de agua a 42 °C para realizar un shock térmico de 45 s de duración. Se colocó el tubo inmediatamente en hielo, se agregaron 0,8 ml de medio Super Optimal Broth (SOC: triptona 2 % p/v, extracto de levadura 0,5 % p/v, NaCl 8,56 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM) y se incubó 1 h a 37 °C. Luego de la incubación, las

bacterias se sembraron en placas de LB-agar con 100 µg/ml de ampicilina (a excepción del plásmido conteniendo eGFP que contiene selección por kanamicina, 50 µg/ml), y se incubaron a 37 °C durante una noche.

#### 4.3. Amplificación y extracción de ADN plasmídico a escala mediana

Se transfirió una colonia de bacterias transformada con el plásmido de interés a 5 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección. Se incubó a 37 °C por 8 hs con agitación vigorosa (300 r.p.m. aproximadamente). Se inocularon con 0,5 ml del cultivo de bacterias 200 ml de LB con antibiótico, y se incubó a 37 °C durante toda la noche con agitación vigorosa. Posteriormente, se centrifugó el cultivo durante 30 min a 4000 r.p.m. a 4 °C y se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando un kit comercial de la compañía QIAGEN que utiliza columnas de afinidad, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.4. Amplificación y extracción de ADN plasmídico a escala pequeña por lisis alcalina

Se tomó una colonia y se inocularon 5 ml de LB suplementado con el antibiótico de selección. Se incubó a 37°C por 16 hs aproximadamente con agitación vigorosa (aproximadamente 300 r.p.m.). Se cosecharon las bacterias por centrifugación a máxima velocidad durante 1 min a 4 °C. Se removió el medio de cultivo por aspiración. Se resuspendió el sedimento bacteriano en 0,25 volúmenes de STE (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl y 1 mM EDTA) pre-enfriado en hielo y se centrifugó con las mismas condiciones anteriores. Se resuspendió el sedimento bacteriano en 100 µl de Solución para lisis I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA) pre-enfriada en hielo. Se añadieron 200 µl de Solución para lisis II (200 mM NaOH, 1 % SDS p/v), se mezcló por inversión (de 4 a 6 veces), y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se adicionaron 150 µl de Solución para lisis III (con acetato de potasio y ácido acético glacial) fría y se mezcló inmediatamente por inversión (de 4 a 6 veces). Se incubó 3 min en hielo y luego se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a 4 °C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se precipitó el ADN mediante el agregado de 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol al 95% (v/v). Se incubó por 2 hs a -20°C. Luego se centrifugó a 15.000 g durante 30 min a 4 °C. Se lavó el precipitado con 100 µl

de etanol al 70 %. Se centrifugó a 15.000 g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar durante 5-10 min. Por último, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua miliQ.

#### 4.5. Cuantificación de ADN

Se midió la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Delaware, Estados Unidos). Para determinar posibles contaminaciones de la muestra, se tuvieron en cuenta las relaciones de absorbancia 230/260 y 280/260.

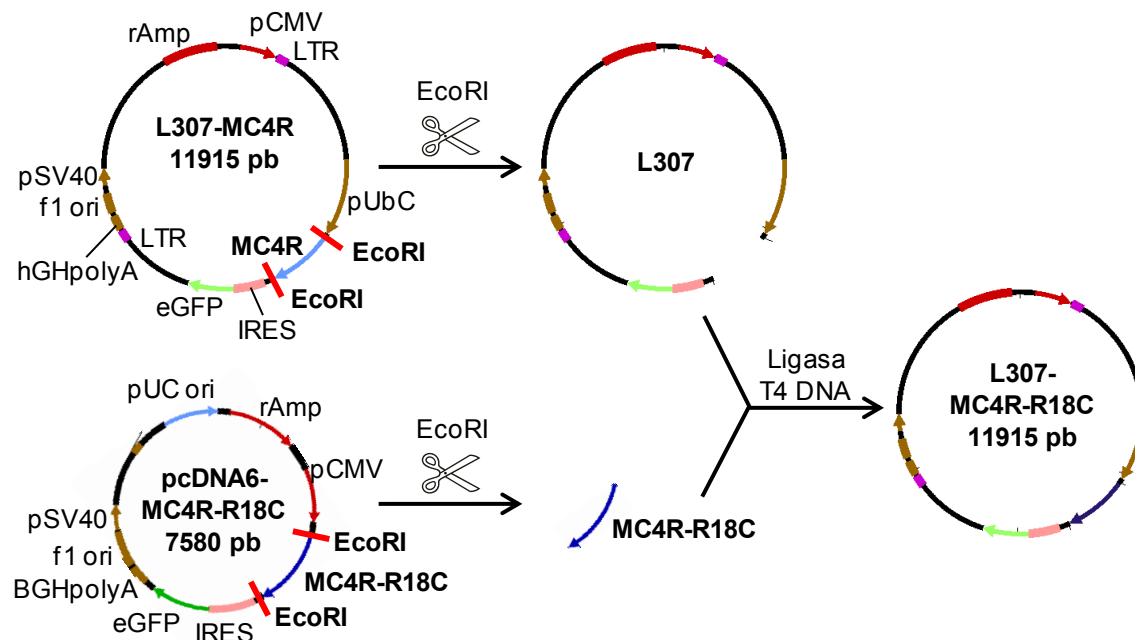
#### 5. Mutación y subclonado de la secuencia codificante del MC4R

Para realizar la mutación del MC4R correspondiente al cambio del aminoácido arginina por cisteína en la posición 18 se utilizó el kit comercial QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, cat#200522). Este kit permite mutar plásmidos de hasta 10 kilo pares de bases (kpb). La secuencia codificante del MC4R dentro del vector L307, comprende 11,1 kpb, por lo tanto, para poder realizar la mutación, primero se subclonó la secuencia del MC4R-IRES-eGFP en un vector de menor tamaño, el pcDNA6 (6 kpb). Se utilizaron las enzimas de restricción BamHI y NotI para remover la secuencia MC4R-IRES-eGFP del vector L307. Luego se incorporó esta secuencia dentro del vector pcDNA6 que previamente fue linealizado con las mismas enzimas, mediante una reacción de ligación. Una vez corroborada por secuenciación la correcta clonación, se procedió a realizar la mutación. Se diseñaron los cebadores conteniendo la mutación deseada con el programa QuikChange Primer Design ([www.agilent.com/genomics/qcpd](http://www.agilent.com/genomics/qcpd)).

Cebador sentido: TCCACCTCTGGAAGTGCAGCAGCTACGGGCTGC

Cebador anti-sentido: GCAGCCCGTAGCTGCTGCAGTTCCAGAGGTGGA

Se siguieron las instrucciones del fabricante para realizar la mutación y luego se secuenció el plásmido obtenido para verificar la correcta mutación. Esta mutación fue

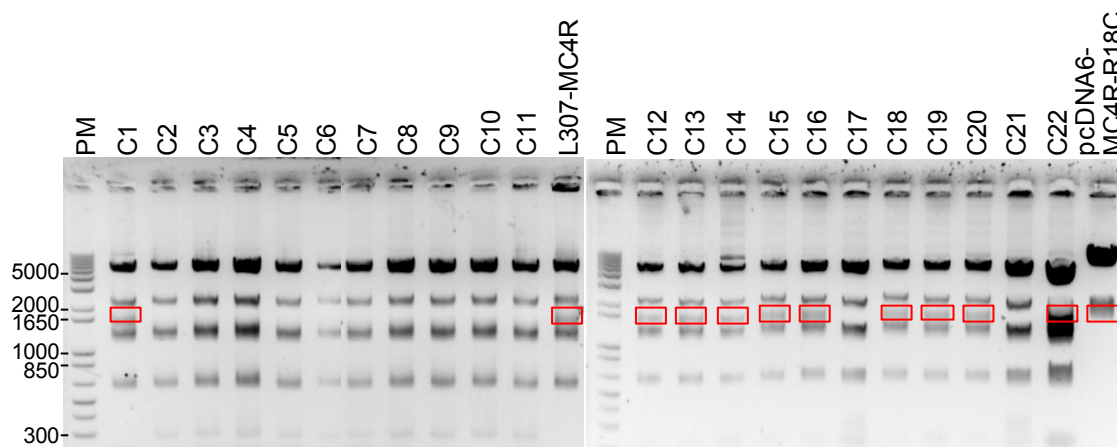


**Figura 2. Estrategia de subclonado del MC4R-R18C desde pcDNA6 a L307.** Los plásmidos L307-MC4R y pcDNA6-MC4R-R18C se digirieron con EcoRI. Luego ambos fragmentos de interés (L307 linealizado e inserto MC4R-R18C) se ligaron con la enzima T4 DNA. pUbC: promotor de ubiquitina; IRES: sitio interno de unión al ribosoma; hGHpolyA: cola de adeninas; f1 ori: origen de replicación en bacterias; pSV40: promotor y origen de replicación en células eucariotas; rAMP: cassette de genes que confieren resistencia a Ampicilina; pCMV: promotor de citomegalo virus; LTR: repetición terminal larga; BGHPolyA: cola de adeninas; pUC ori: promotor y origen de replicación en bacterias.

realizada con la colaboración de la Dra. Summer Allen del laboratorio de la Dra. Diane Lipscombe (Brown University, Estados Unidos).

Luego, en nuestro laboratorio se procedió con el subclonado de la secuencia MC4R-R18C del vector pcDNA6 al L307 (figura 2), para que se exprese en células HEK293t bajo la misma regulación que el MC4R salvaje. Se utilizó la enzima EcoRI que removió la secuencia del MC4R-R18C y con la misma enzima se removió la secuencia del MC4R salvaje del L307. Para cada reacción de digestión se utilizaron 10 µg de ADN. Después se chequeó la correcta digestión de los plásmidos en una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Una vez confirmada la digestión se procedió a desfosforilar la mezcla de ADN del fragmento correspondiente al vector L307 linealizado para evitar su recircularización. Luego, ambas mezclas de ADN se corrieron en un gel de preparado de agarosa de bajo punto de fusión (LMP, del inglés *low melting point*). Se extrajeron las partes del gel conteniendo los fragmentos de interés (el fragmento MC4R-R18C y el vector L307 linealizado) y se realizó una extracción fenol/cloroformo (Sambrook, 1989) para aislar el

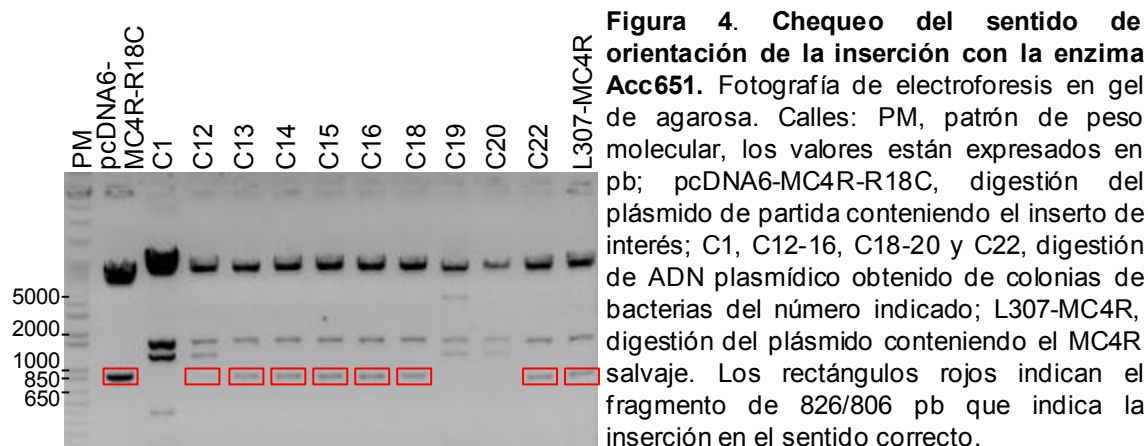
ADN. Se midió la concentración de ADN y se ligaron dos mezclas distintas de ADN:



**Figura 3. Chequeo de la inserción del fragmento MC4R-R18C dentro del vector L307 con la enzima HindIII.** Fotografías de electroforesis en gel de agarosa. Calles: PM, patrón de peso molecular, los valores están expresados en pb; L307-MC4R, digestión del plásmido conteniendo el MC4R salvaje; C1 a C11, digestión de ADN plasmídico obtenido de colonias de bacterias de la condición de ligación 1/1; C12 a C22 digestión de ADN plasmídico obtenido de colonias de bacterias de la condición de ligación 1/5; pcDNA6-MC4R-R18C, digestión del plásmido de partida conteniendo el inserto de interés. Los rectángulos de línea roja indican el fragmento de ADN de 1400 pb que indica inserción del fragmento MC4R-R18C al vector L307.

relación molar vector/inserto 1/1 y 1/5. Luego se transformaron bacterias competentes con ambas mezclas de reacción como fue explicado previamente. Se sembraron placas de Petri con LB-agar y ampicilina, y luego de permitir el crecimiento durante una noche, se picaron distintas colonias de cada condición. Se realizaron extracciones de plásmidos a pequeña escala (Sambrook, 1989) para realizar el chequeo de la correcta inserción del fragmento al vector. En primer lugar se realizaron cortes con la enzima de restricción HindIII, lo que permite diferenciar entre el vector recircularizado y el vector conteniendo el inserto. Se corrió un gel de agarosa y, como se muestra en la figura 3, la banda distintiva de la inserción tiene un peso molecular de 1400 pb. Entonces, 10 de 22 colonias chequeadas adquirieron el inserto (C1, C12-16, C18-20 y C22). El corte con HindIII no permite diferenciar el sentido de orientación de la inserción. Entonces, se utilizó la enzima de restricción Acc651, la cual genera un fragmento de 1250 pb para la inserción en sentido incorrecto, y dos fragmentos de 826 y 803 pb que no se logran resolver pero se observan alrededor de los 800 pb para la inserción en sentido correcto,. Como se muestra en la figura 4, las colonias 12 a 16, la 18 y la 22 adquirieron el fragmento en la dirección correcta. Por último, chequeamos que el fragmento sub-clonado contenga la mutación R18C con la enzima PstI. El corte enzimático genera un fragmento de 980 pb cuando la

mutación está presente, a diferencia de un fragmento de 1040 pb cuando no existe mutación. La figura 5 muestra que todas las colonias chequeadas adquirieron el fragmento con la mutación. Luego, se transfetaron células HEK293t con los plásmidos obtenidos de distintas colonias que mostraron la inserción correcta del fragmento para verificar el nivel de fluorescencia. La funcionalidad del plásmido fue ensayada (ver sección Resultados, Capítulo 3).



## 6. Electrofisiología

Se realizaron registros de *patch-clamp* en configuración de célula entera utilizando la modalidad de fijación de voltaje. La técnica de *patch-clamp* consiste en acercarse a la célula con una micro-pipeta (dentro posee un electrodo Ag/AgCl) llena de una solución interna, en general de composición iónica similar al citoplasma celular debido a que esta se dializará dentro de la célula. Una vez que se toca la célula con la micro-pipeta (se distingue por el cambio en la resistencia del sistema observado en el monitor de la computadora con el software del programa utilizado), se realiza una leve succión desde una manguera conectada a la micro-pipeta por la parte trasera para obtener un sello de alta resistencia ( $> 1 \text{ G}\Omega$ ). Si este sello permanece estable, se realiza otra succión para provocar el rompimiento de la membrana y establecer contacto directo con el citoplasma celular. Si la resistencia del circuito se mantiene alta, se ha obtenido un *patch* en configuración de célula entera y se puede proseguir con el registro de las corrientes. La solución que baña a las células está en contacto con el electrodo de tierra de AgCl que permite el cierre del circuito.

Se utilizó un amplificador Axopatch 200 (Molecular Devices, California, Estados Unidos). Los datos fueron muestreados a 20 kHz y filtrados a 10 kHz (-3 dB) utilizando el programa pClamp8.2 (Molecular Devices) mediante un conversor analógico-digital Digidata 1322A (Molecular Devices). Se utilizaron micro-electrodos de registro constituidos por un alambre de plata clorada (Ag/AgCl) incluido en una micro-pipeta de vidrio/borosilicato (diámetro externo 1,5 mm e interno 1,1 mm, King Precision Glass Inc., cat#KG-33, California, Estados Unidos), fabricadas con un estirador de pipetas (Sutter Instrument Co., P-80, California, Estados Unidos) y cargadas con solución intracelular. Se aceptaron resistencias de las micro-pipetas de entre 2 y 5 MΩ y se admitieron resistencias en serie < 10 MΩ. Se utilizó una compensación del 80 % con 10 μs de tiempo de retardo. Se sustrajeron de manera *on-line* las corrientes de fuga usando un protocolo P/-4 (excepto para experimentos de pulsos evocados y medición de corrientes post-sinápticas inhibitorias miniatura). Todos los registros fueron realizados a temperatura ambiente.

### 6.1. Registros de corrientes de calcio en células HEK293t transfectadas

Para registrar las corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ) a través de los  $Ca_v$  es necesario inhibir las corrientes nativas de las células HEK293t. Se añadió  $Cs^+$  a la solución interna para bloquear los canales de  $K^+$ . Además, se quela el  $Ca^{+2}$  citoplasmático para aumentar fuerza impulsora del  $Ca^{+2}$  para ingresar a la célula, para esto se utiliza EGTA y EDTA. La solución externa es necesario que contenga  $Ca^{+2}$ , para que sea el ion que permea a través de los  $Ca_v$ . Como se realiza una sobre-expresión de los  $Ca_v$ , puede utilizarse una concentración de  $Ca^{+2}$  similar a la fisiológica (2 mM) debido a que la  $I_{Ca}$  será de amplitud apreciable. La composición de la solución interna (dentro de la micro-pipeta) utilizada fue (en mM): 134 CsCl, 10 EGTA, 1 EDTA, 10 HEPES y 4 MgATP (pH 7,2 con CsOH). Se utilizó una solución externa (solución que baña las células) de composición (en mM): 2  $CaCl_2$ , 1  $MgCl_2$ , 10 HEPES and 140 cloruro de colina (pH 7,4 con CsOH). Se aplicaron pulsos cuadrados de voltaje a -10 (para  $Ca_v1.3$ ) o +10 mV (para  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ ) de 15 ms de duración cada 5 o 10 s, desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. En algunos experimentos se aplicó también un protocolo de pre-pulso de +80 mV de 15 ms de duración, 12,5 ms antes del pulso de registro para remover eficientemente toda la inhibición voltaje dependiente de los  $Ca_v$  (Raingo *et al.*, 2007; Lopez Soto & Raingo, 2012). Los protocolos de voltaje utilizados para obtener las relaciones de voltaje-corriente



(curvas IV) consistieron en pulsos cuadrados de voltaje de 20 ms de duración cada 5 s desde -60 a +80 mV aumentando de a 5 mV.

## 6.2. Registros de corrientes iónicas en neuronas en cultivo

Se realizó *patch-clamp* entre los días 6 y 28 de cultivo en neuronas de amígdala de ratón. Se utilizó la misma solución interna descrita para los registros en células HEK293t. Se midieron las corrientes de sodio ( $I_{Na}$ ) con una solución externa alta en sodio, de composición (en mM): 135 NaCl, 4,7 KCl, 1,2  $MgCl_2$ , 2,5  $CaCl_2$ , 10 HEPES y 10 glucosa (pH 7,4 con NaOH). Para medir las corrientes  $Ca_v$  se reemplazó la solución externa alta en sodio por una solución externa alta en bario, para amplificar las corrientes a través de los  $Ca_v$ . Composición de la solución (en mM): 1  $MgCl_2$ , 10 HEPES, 10 glucosa, 10  $BaCl_2$ , 20 cloruro de tetraetilamonio, 110 cloruro de colina, 0,001 tetrodotoxina (TTX, Sigma Aldrich, cat#T8024, Missouri, Estados Unidos) (pH 7,4 con CsOH). El potencial de mantenimiento utilizado fue de -80 mV, y se aplicaron pulsos de voltaje de 0 mV de 20 ms de duración en intervalos de 10 s.

## 6.3. Registros de corrientes inhibitorias post-sinápticas en cultivos primarios de neuronas de amígdala

Entre los días 15 y 22 en cultivo, se registraron corrientes inhibitorias post-sinápticas (IPSCs, del inglés, *inhibitory post-synaptic currents*) en cultivos primarios de neuronas de amígdala de ratón. Se utilizó una solución interna conteniendo bloqueador de canales de sodio operados por voltaje, la lidocaína N-ethyl bromide (QX314, Sigma Aldrich, cat#L5783) para bloquear las  $I_{Na}$  de la neurona clampeada y así evitar la generación de potenciales de acción en esta neurona, que interferirían en la medición de las IPSC. La composición de la solución interna fue (en mM): 115 Cs-metasulfonato, 10 CsCl, 5 NaCl, 10 HEPES, 20 tetraetilamonio, 4 Mg-ATP, 0,3 NaGTP, 0,6 EGTA y 10 QX314. La solución externa utilizada fue la de alto sodio mencionada previamente. En la solución externa se adicionó un antagonista de receptores AMPA, 6-cyano-7-nitro quinoxalina-2,3-diona (CNQX, Alomone Labs, cat#c-141) en concentración 10  $\mu$ M. Las neuronas se mantuvieron a -80 mV y, para evocar respuestas post-sinápticas, se utilizó estimulación eléctrica de campo con electrodos de platino paralelos con una duración de 1 ms y una amplitud de 20



mA. Los IPSC miniatura (mIPSC) se registraron en presencia de TTX 1  $\mu$ M en la solución externa para bloquear posibles potenciales de acción de las neuronas en contacto con la célula clampeada. El análisis de la frecuencia y amplitud de los mIPSC se realizó con el programa MiniAnalysis 6.0.7 (Synaptosoft). Adicionalmente, en algunos experimentos se aplicó un pulso de solución externa hiper-osmótica alta en sacarosa (0,5 M) en presencia de 1  $\mu$ M de TTX para evocar una liberación masiva de neurotransmisores independientes de los potenciales de acción.

#### 6.4. Registros de corrientes excitatorias post-sinápticas en cultivos primarios de neuronas de amígdala

Al igual que las IPSC, las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) se registraron entre los días 15 y 22 de cultivo. Con la misma soluciones interna y externa, excepto en el contenido de CNQX que fue reemplazado por picrotoxina 50  $\mu$ M (Sigma Aldrich, cat#P1675) para inhibir los receptores GABA<sub>A</sub> y así aislar las corrientes glutamatérgicas.

### 7. Cirugías estereotáxicas

Los ratones salvajes de entre 2 y 3 meses de edad fueron anestesiados con Ketamina (10 mg/kg) y Xylazina (1 mg/kg). Se les implantó una cánula guía estéril (4 mm de longitud, calibre 22, Plastic One) dentro del ventrículo lateral (intracerebroventricular, icv). Las coordenadas para la colocación fueron: antero-posterior, 0,3 mm; lateral, +1,0 mm y ventral, 2,3 mm. Después, se colocó un obturador calibre 28 en cada cánula. Luego de la cirugía, los animales se mantuvieron aislados en cajas individuales y se les permitió la recuperación por al menos 5 días. Para reducir el estrés, los ratones fueron acostumbrados al manejo removiéndoles la cánula y reemplazándola por otra por al menos 4 días antes del experimento. La correcta colocación de la cánula se confirmó por observación histológica una vez finalizado el experimento. La mañana del día experimental, los animales fueron inyectados con 4  $\mu$ L de vehículo icv (fluido cerebroespinal artificial) conteniendo o no el agonista específico de MC4R, RO27-3225 (4  $\mu$ g/ratón), o el bloqueador específico de los Ca<sub>v</sub>2.2  $\omega$ -conotoxina GVIA (0,1  $\mu$ g/ratón). Todas las inyecciones se realizaron en un tiempo de 2 min a través de una aguja calibre 30 extendida 0,5 mm por debajo de la cánula guía y conectada con un tubo de polietileno

a una jeringa Hamilton de 5 µL. La aguja se mantuvo en el lugar por 2 min posteriores a la inyección para evitar el reflujo de la solución inyectada. Luego de 2 hs, los animales se anestesiaron con hidrato de cloral (500 mg/kg) y se perfundieron con formaldehído al 4% utilizando el protocolo descrito en (Cabral *et al.*, 2012).

## 8. Inmunocitoquímicas

### 8.1. Inmunohistoquímica contra c-fos en rebanadas de cerebro

Los cerebros perfundidos fueron removidos, post fijados con formaldehído al 4 % e inmersos en una solución de sacarosa al 20%. Luego se cortaron coronalmente con un espesor de 20 µm en tres series equivalentes con un criostato como lo descrito en (Cabral *et al.*, 2012). Para la inmunohistoquímica contra c-fos, las secciones de cerebro se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1%, se trataron con solución de bloqueo (suero de burro al 3% y 0,25% de Tritón en solución salina de buffer fosfato, PBS), y se incubaron con el anticuerpo anti-c-fos (Calbiochem/Oncogene, 1:15000, cat#PC38, Darmstadt, Hesse, Alemania) durante 2 días a 4°C. Luego, las secciones se trataron con el anticuerpo biotinilado anti-conejo (Jackson Immuno Research Laboratories, 1:1000, West Grove, Pensilvania, Estados, Unidos) durante 1 h, y con el kit comercial Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos) por 1 h, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La señal visible se desarrolló con 3-3'-diaminobenzidina/solución de níquel, mostrando un precipitado negro/púrpura. Las secciones de cerebro fueron secuencialmente montadas en portaobjetos de vidrio, y los cubreobjetos se colocaron con medio de montaje. Los resultados se visualizaron utilizando un microscopio de campo claro. Y las imágenes se adquirieron con una cámara digital Nikon DS-Ri1. Para editar las imágenes (ajuste de contraste y brillo) se utilizó el programa ADOBE PHOTOSHOPCS2. El análisis cuantitativo se realizó con tres animales por condición.

### 8.2. Inmunocitoquímica contra c-fos en cultivos primarios neuronales

Las neuronas de amígdala cultivadas en vidrios (ver más arriba) fueron tratadas o no con el agonista inverso del MC4R, AgRP, en concentración 100 nM, durante 24 hs.

Luego, fueron estimuladas o no con el activador de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  (S)-(-)Bay K8644 (BayK) en concentración 1  $\mu\text{M}$  por 2 hs. Luego, las neuronas de todas las condiciones fueron lavadas 3 veces con PBS durante 5 min y posteriormente fijadas por 30 min con formaldehído al 4%. Luego, se realizaron otros 3 lavados de 5 min con PBS y posteriormente se incubaron con solución de bloqueo (suero de burro al 3% y 0,25% de Triton en PBS) y permeabilizante durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-c-fos (Santa Cruz, 1:200, cat#sc-7202) durante toda la noche a 4 °C. Al otro día se lavaron 3 veces con PBS por 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Invitrogen, 1:1000, cat#ab150077) durante 2 hs a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min cada vez. Por último, los vidrios con neuronas se montaron con solución de montaje conteniendo Hoeschst. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital Nikon DS-Ri1. Para editar las imágenes (ajuste de contraste y brillo) se utilizó el programa FIJI-ImageJ.

### 8.3. Inmunocitoquímica contra $\text{Ca}_v2.1$ en cultivos primarios neuronales

Las neuronas de amígdala cultivadas en vidrios fueron tratadas o no por 24 hs con AgRP 100 nM. Luego de la incubación, fueron lavadas 3 veces con PBS durante 5 min y posteriormente fijadas por 30 min con formaldehído al 4%. Luego, se realizaron otros 3 lavados de 5 min con PBS y posteriormente se incubaron con solución de bloqueo (suero de burro al 3% y 0,25% de Triton en PBS) y permeabilizante durante 1 h a temperatura ambiente. Se incubaron con el anticuerpo primario anti-  $\text{Ca}_v2.1$  (Alomone Labs, 1:500, cat# ACC-001) durante toda la noche a 4 °C. Al otro día se lavaron 3 veces con PBS por 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa 488 (Invitrogen, 1:1000, cat#ab150077) durante 2 hs a temperatura ambiente en oscuridad. Luego, se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min. Por último, los vidrios con neuronas se montaron con solución de montaje conteniendo Hoeschst. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital Nikon DS-Ri1. Se tomaron 20 microfotografías en serie en el eje z (con los mismos ejes x e y) con 0,49  $\mu\text{m}$  de diferencia, abarcando 9,8  $\mu\text{m}$  totales. Para editar las imágenes (apilamiento de las 20 microfotografías, ajuste de contraste y brillo) se utilizó el programa FIJI-ImageJ.

#### 8.4. Análisis cuantitativo de los datos de inmunocitoquímica en rebanadas de cerebro

Para este análisis, la amígdala fue subdividida tal como fue sugerido previamente por (Sah *et al.*, 2003), incluyendo: (i) la subdivisión basolateral, conteniendo la amígdala basolateral, la amígdala basomedial y el núcleo basal accesorio (BLA); (ii) la subdivisión cortical, incluyendo el núcleo cortical y los núcleos del tracto olfatorio lateral; y (iii) la subdivisión centro-medial compuesta por la amígdala medial y la amígdala central (CeA). Los límites neuroanatómicos se definieron según el atlas de Paxinos & Franklin (2001). El número total de células c-fos-inmunoreactivas (IR) se cuantificó en la CeA y BLA de la amígdala. Para este propósito, se cuantificaron las células que presentaron un precipitado negro/púrpura nuclear en una de las tres series completas de las secciones coronales. Estos números se sumaron y multiplicaron por tres. El número total de células c-fos-IR de cada subdivisión de la amígdala se estimó en secciones entre el bregma -0,70 y -0,94 mm. Todos los análisis se llevaron a cabo en las mismas condiciones ópticas y de luz. Los datos se expresaron como número total de células c-fos-IR por subdivisión de la amígdala por lado.

#### 8.5. Análisis cuantitativo de los datos de inmunocitoquímica contra c-fos en cultivos primarios neuronales

Se tomaron microfotografías en distintos campos de los preparados (más de 20 por condición) y se contó en número de núcleos neuronales (marca azul) y el número de núcleos neuronales positivos para c-fos (marca verde). Se calculó el porcentaje de neuronas c-fos-IR para cada campo y luego se promediaron los porcentajes en cada condición experimental.

### 9. Drogas

Se utilizó el agonista sintético de MC3R y MC4R melanotan II (MTII, Phoenix Pharmaceutical, cat#043-23, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Alemania), el agonista específico del MC4R, RO27-3225 (Sigma Aldrich, cat#R3905); el agonista inverso del MC4R, AgRP (Phoenix Pharmaceuticals, cat #003-57); el inhibidor específico de la proteína Gs, la toxina del cólera (ChTx, Sigma Aldrich, cat#C8052); un inhibidor

específico de la proteína Gi/o, la toxina Pertussis (PTx, Sigma Aldrich, cat#P7208); el bloqueador de los  $\text{Ca}_v2.1$ , la  $\omega$ -agatoxina-IVA (Peptides International, cat#4256-s, Kentucky, Estados Unidos); el bloqueador de los  $\text{Ca}_v2.2$ , la  $\omega$ -conotoxina-GVIA (Alomone lab., cat#C-300, Jerusalén, Israel); un antagonista de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ , nifedipina (Sigma Aldrich, cat#N7634); un agonista de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ , (S)-(-)-Bay K8644 (BayK, Sigma Aldrich, cat#B133); un inhibidor de la proteína MEK1/2, PD98054 (Sigma Aldrich, cat#sc-3532).

## 10. Estadística

Analizamos y graficamos los datos utilizando los programas OriginPro 8 (OriginLab Corp., Massachusetts, Estados Unidos) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., California, Estados Unidos). En todos los casos examinamos la distribución normal por el test de D'Agostino-Pearson. La mayoría de los conjuntos de datos no fueron normales, por lo que utilizamos test estadísticos no paramétrico: test de Wilcoxon *signed-rank*, para comparar los datos con el valor cero; test de Mann-Whitney, para comparar dos grupos de datos entre sí; test de Wilcoxon *matchet-pairs signed Rank*, para comparar de manera apareadas dos grupos de datos; test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos de datos entre sí, y a su vez se compararon los grupos de datos con el grupo control.

Se consideró significancia estadística con un  $p < 0,05$ . Los datos se expresan como la media  $\pm$  el error estándar con el número de observaciones entre paréntesis.

Las curvas de concentración de MTII *versus* % de inhibición de la corriente para células HEK293t y para neuronas en cultivo se ajustaron a ecuaciones de Hill, y se compararon los parámetros obtenidos con el test F de Fisher ( $p < 0,05$ , GraphPad Prism 5).

Los datos de las curvas IV fueron ajustadas a ecuaciones Boltzmann-lineal:

$$y = P1 \cdot (x - V_{rev}) / (1 + \exp(-(x - V_{m1/2})/k)).$$

Donde P1 es una constante de ajuste,  $V_{rev}$  es el potencial de reversión, al cual la corriente es igual a cero aunque los canales estén abiertos;  $V_{1/2}$  es el potencial medio, al cual la mitad de los canales se encuentran abiertos; y k es una constante relacionada a la pendiente que toma la curva IV hasta llegar al máximo de corriente.

## Resultados

## Capítulo 1:

Impacto de la actividad constitutiva y de la dependiente de agonista del MC4R sobre la  $I_{Ca}$  de los  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$

## Obtención de los parámetros biofísicos de las $I_{Ca}$ de los distintos subtipos de $Ca_v$

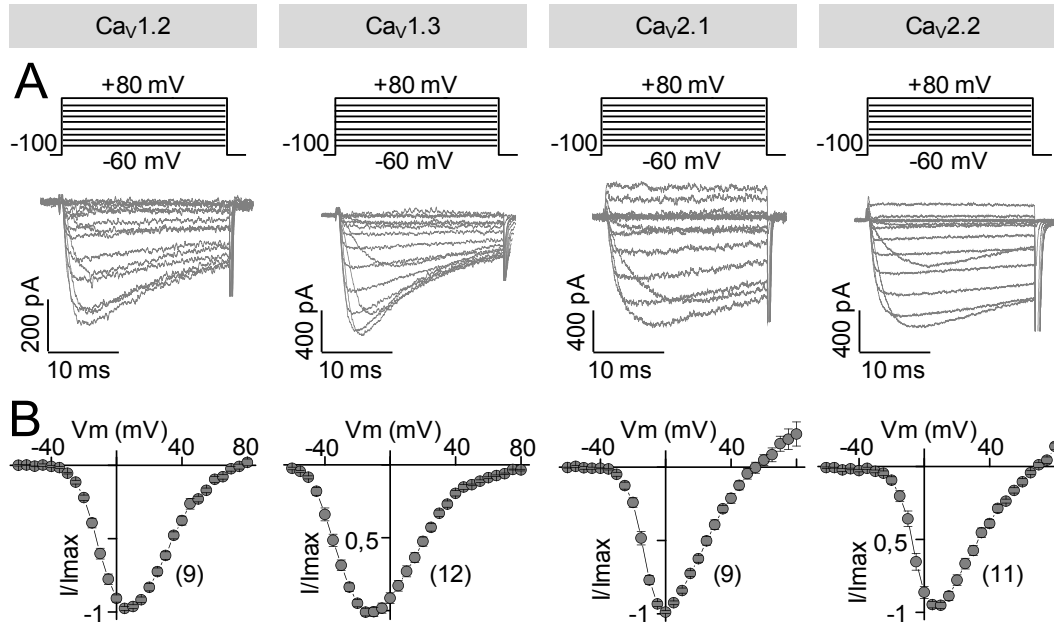
Como un primer paso de este trabajo de tesis estudiamos el comportamiento de las corrientes de calcio ( $I_{Ca}$ ) de distintos  $Ca_v$ :  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ . Como estos canales se activan por voltajes despolarizantes, entonces podemos estudiar su actividad estimulándolos con pulsos cuadrados de voltaje mediante la técnica electrofisiológica de *patch-clamp*. Utilizamos el modo con fijación de voltaje en configuración “célula entera”, que nos permite medir la corriente macroscópica, es decir la corriente que pasa a través de todos los  $Ca_v$  localizados en la membrana celular.

Como modelo de estudio utilizamos  $Ca_v$  recombinantes expresados transitoriamente en una línea celular. Transfectamos la línea celular de mamífero HEK293t con la técnica de liposomas catiónicos. Realizamos co-transfecciones en proporciones molares iguales (1:1:1) de los plásmidos conteniendo el ADN complementario (ADNc) de las secuencias codificantes para las subunidades formadoras del poro  $Ca_v\alpha_11.2$ ,  $Ca_v\alpha_11.3$ ,  $Ca_v\alpha_12.1$  o  $Ca_v\alpha_12.2$  y las subunidades auxiliares ( $Ca_v\alpha_2\delta_1$  y  $Ca_v\beta_3$ ) necesarias, entre otras funciones, para que el canal migre a la membrana; además adicionamos a la mezcla de ADNc una cantidad fija de plásmido conteniendo la secuencia codificante para la proteína eGFP para seleccionar las células transfectadas mediante la excitación con luz ultravioleta. Utilizando la técnica de liposomas catiónicos se logra que los distintos plásmidos ingresen a la célula de manera representativa a las cantidades contenidas en la mezcla de ADNc, por lo tanto, las células fluorescentes verdes que seleccionemos, además de eGFP, también habrán adquirido los plásmidos codificantes para las subunidades de los  $Ca_v$ .

Luego del tiempo necesario para la expresión de los  $Ca_v2.2$  (24 hs (Raingo *et al.*, 2007)) y  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  (48 hs (Helton *et al.*, 2005; Lopez Soto *et al.*, 2015)), seleccionamos células fluorescentes para registrar las  $I_{Ca}$  y estudiar sus parámetros biofísicos. Una vez realizado el *patch* (ver Materiales y Métodos) fijamos el potencial de las células a -100 mV y aplicamos protocolos de voltaje para estudiar el comportamiento de los  $Ca_v$  a distintos potenciales. En primer lugar, realizamos un protocolo con un estímulo a un voltaje fijo, alrededor del cual, según datos de la bibliografía, los  $Ca_v$  se activan (entre -10 y +10 mV). Los  $Ca_v$  se encuentran inactivados por efecto del potencial



de reposo de las células HEK293t, el cual se encuentra alrededor de -35 mV (Chemin *et al.*, 2000).



**Figura 6. Comportamiento de las  $I_{Ca}$  macroscópicas de cada  $Ca_v$  con el cambio de voltaje.** Trazos representativos de  $I_{Ca}$  (A) y curvas IV normalizadas (B) para cada subtipo de  $Ca_v$  estudiado transfectedo en células HEK293t. La corriente fue estimulada por pulsos cuadrados de voltaje (desde -100 a -60/+80 mV) por 25 ms cada 5 s. El número entre paréntesis indica la cantidad de  $I_{Ca}$  registradas para cada condición.

Cuando nosotros fijamos el voltaje en -100 mV, con el tiempo se remueve la inactivación por voltaje de los  $Ca_v$  y aproximadamente luego de 1 min, la  $I_{Ca}$  alcanza su valor máximo. Luego, para estudiar la relación entre el voltaje aplicado y la  $I_{Ca}$  evocada para cada subtipo de  $Ca_v$ , realizamos curvas corriente-voltaje (curvas IV) en las cuales, desde -100 mV como potencial de reposo, se aplican pulsos cuadrados de voltaje de 25 ms cada 5 s que comienzan en -60 mV y aumentan de a 5 mV hasta llegar a +80 mV (figura 6). A partir de las curvas IV podemos obtener información de distintos parámetros biofísicos de la activación por el voltaje de los  $Ca_v$ . Ajustando los datos de las  $I_{Ca}$  obtenidos a cada potencial con una ecuación de Boltzmann combinada con una ecuación lineal (ver Materiales y Métodos), podemos determinar el voltaje medio de activación ( $V_{1/2}$ ) de los  $Ca_v$ , el voltaje de reversión ( $V_{rev}$ ) y la constante de activación ( $k$ ). Los datos obtenidos para cada subtipo de  $Ca_v$  se indican en la tabla 1. A partir de las curvas IV también puede obtenerse el potencial al cual se registra la amplitud máxima de la  $I_{Ca}$ . Así, utilizando como ion de carga al  $Ca^{+2}$  en concentración 2 mM, encontramos que para 3 de

los 4  $\text{Ca}_v$  estudiados el máximo de corriente se encuentra aproximadamente a +10 mV, a excepción del canal  $\text{Ca}_v1.3$  que presenta su máximo a -10 mV.

Así, luego de obtener los parámetros biofísicos de cada  $\text{Ca}_v$  y su máximo de corriente, contamos con las condiciones adecuadas para proseguir con el estudio del efecto de la actividad del MC4R sobre los  $\text{Ca}_v$ .

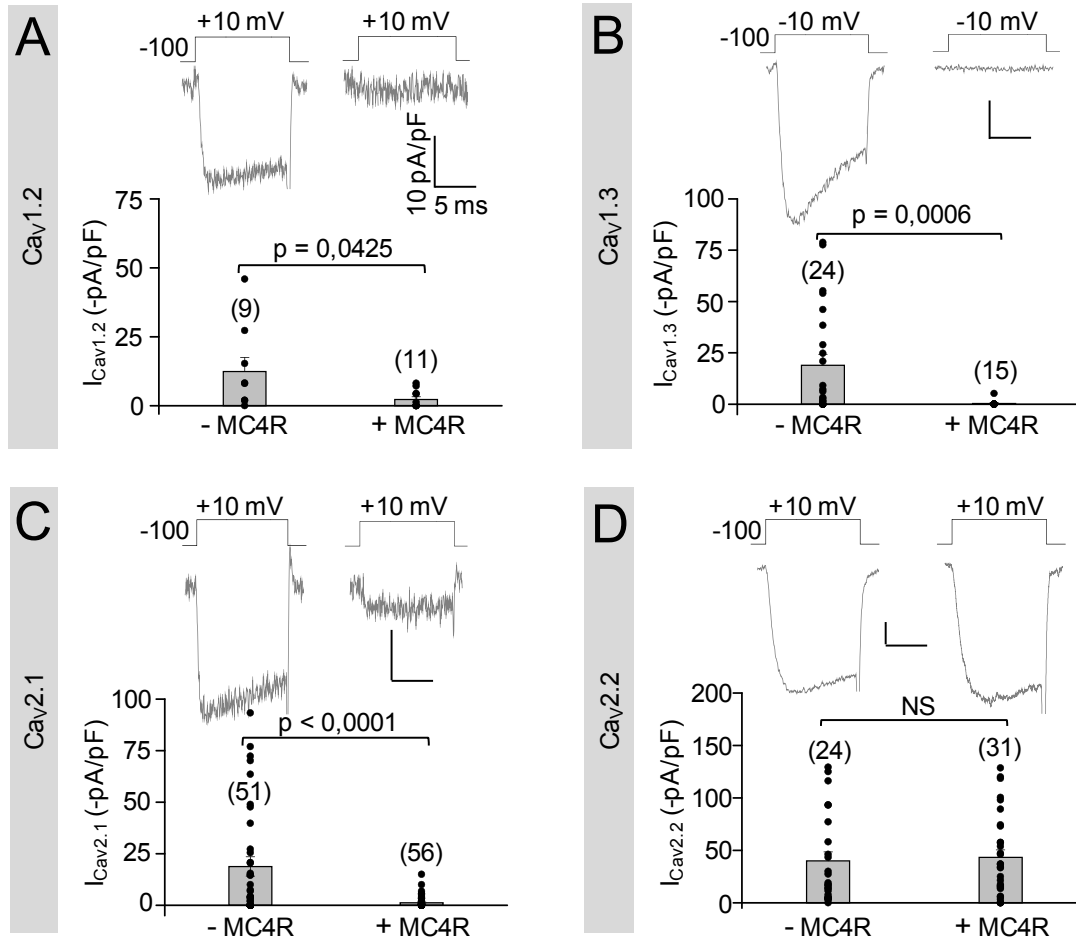
	$V_{1/2}$ (mV)	$V_{rev}$ (mV)	k
$\text{Ca}_v1.2$	$-6,0 \pm 1,4$	$59,1 \pm 2,1$	$7,0 \pm 0,3$
$\text{Ca}_v1.3$	$-29,0 \pm 1,1$	$48,8 \pm 1,3$	$7,5 \pm 0,9$
$\text{Ca}_v2.1$	$-13,7 \pm 0,6$	$57,6 \pm 7,4$	$4,1 \pm 0,2$
$\text{Ca}_v2.2$	$-4,6 \pm 1,1$	$61,3 \pm 1,7$	$4,8 \pm 0,2$

**Tabla 1. Parámetros biofísicos de cada  $\text{Ca}_v$  estudiado.** Los valores fueron obtenidos ajustando los datos de las curvas IV de cada célula con una ecuación de Boltzman-lineal y luego los parámetros de cada subtipo de  $\text{Ca}_v$  fueron promediados.

## Efecto de la co-expresión del MC4R sobre la $I_{\text{Ca}}$ basal de cada subtipo de $\text{Ca}_v$

Como mencioné en la Introducción, el MC4R posee actividad constitutiva, por lo que es suficiente su expresión para que se activen vías intracelulares de señalización. Para estudiar si la actividad constitutiva del MC4R es capaz de modular la actividad de los  $\text{Ca}_v$  nosotros co-transfectamos cada subtipo de  $\text{Ca}_v$  (incluyendo las tres subunidades que conforman el complejo  $\text{Ca}_v$ :  $\text{Ca}_v\alpha_1$ ,  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$  y  $\text{Ca}_v\beta_3$ ) con el MC4R en relación 1:1 molar entre los plásmidos del complejo  $\text{Ca}_v$  y el MC4R. Comparamos la densidad de  $I_{\text{Ca}}$  (amplitud de  $I_{\text{Ca}}$ /capacitancia celular) en las células transfectadas (verdes bajo luz ultravioleta) entre la condición con el MC4R expresado, y la condición control: células expresando sólo cada uno de los  $\text{Ca}_v$  + eGFP, o cada  $\text{Ca}_v$  + MC3R. El MC3R presenta un 76% de homología con MC4R (Kim *et al.*, 2002), y a diferencia de este último, no presenta actividad constitutiva (Kim *et al.*, 2002). Ambos controles mostraron valores similares de densidad de  $I_{\text{Ca}}$ , por lo que fueron agrupados como una misma condición (datos no mostrados). Debido a que en estos experimentos comparamos el nivel de densidad de  $I_{\text{Ca}}$  entre grupos independientes de células y a fin de evitar un aumento en la dispersión típica

en los valores de las  $I_{Ca}$  de los  $Ca_v$  (Scholze *et al.*, 2001; Sandoval *et al.*, 2007)

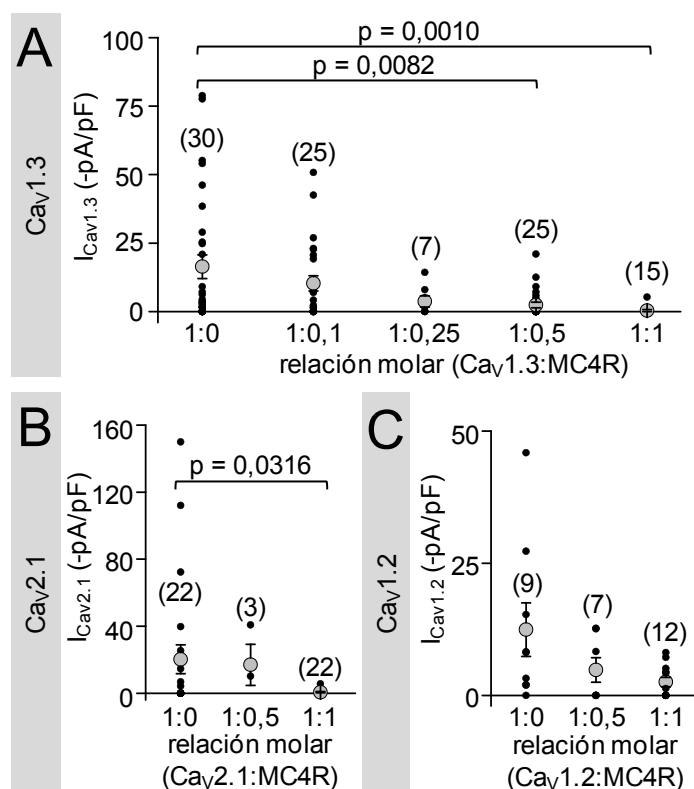


**Figura 7. La presencia de MC4R disminuye la  $I_{Ca}$  basal de  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  pero no la de  $Ca_v2.2$ .** Trazos representativos, valores promedio (barras) y valores individuales (puntos negros) de  $I_{Ca}$  (en pA/pF) para células HEK293t expresando  $Ca_v1.3$  (A),  $Ca_v1.2$  (B),  $Ca_v2.1$  (C) y  $Ca_v2.2$  (D) sin (- MC4R) o con (+ MC4R) MC4R. Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 ó -10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas para cada condición. Las líneas de escala corresponden a los mismos valores que en A.

realizamos registros de la  $I_{Ca}$  en la condición control en todos los días experimentales. Los resultados mostrados en la figura 7 indican que los  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  co-expresados con MC4R presentan valores menores de densidad de  $I_{Ca}$  que en condiciones control, mientras que la densidad de la  $I_{Ca}$  para el  $Ca_v2.2$  permanece en valores similares a la condición control. Para descartar que la ausencia de efecto del MC4R sobre las  $I_{Ca}$  del  $Ca_v2.2$  se deba a que este  $Ca_v$  se co-expresa con MC4R por 24 hs, y el resto de los  $Ca_v$  lo hacen por 48 hs, realizamos experimentos con  $Ca_v2.2$  luego de 48 hs de expresión. Para esto, transfectamos células HEK293t con el  $Ca_v2.2$  (incluyendo las

subunidades auxiliares) con y sin MC4R y luego de las 48 hs medimos los niveles de las  $I_{Ca}$ . En estas condiciones experimentales tampoco encontramos diferencias significativas en los valores de las  $I_{Ca}$  registradas (- MC4R=  $-64.8 \pm 22.02$  pA/pF; + MC4R=  $-75.3 \pm 31.1$  pA/pF; NS entre sí,  $p = 0,5$ ;  $n = 13$  y  $5$ , respectivamente).

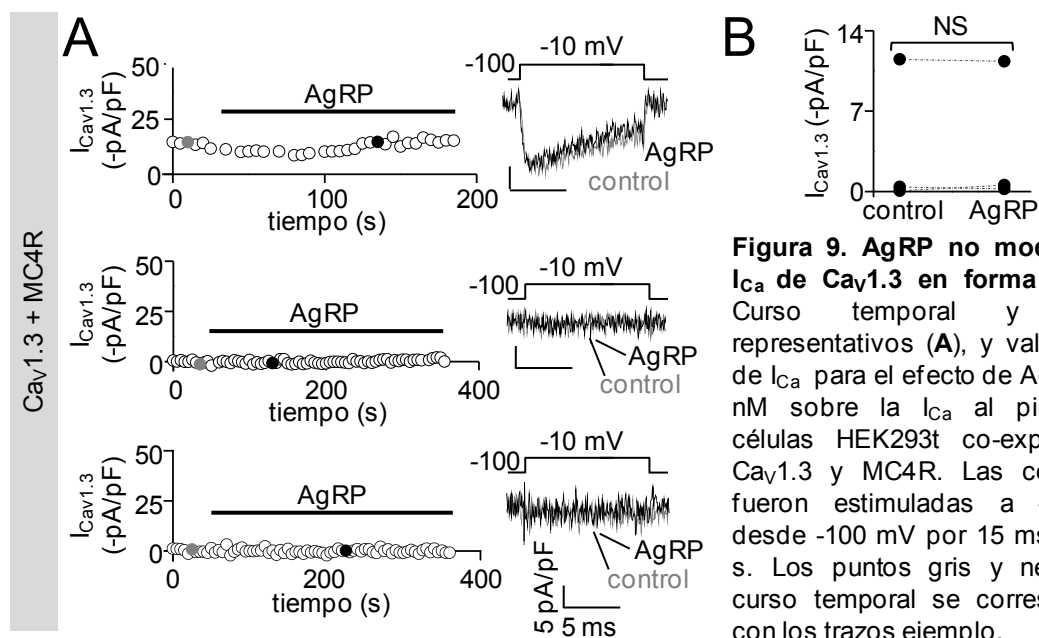
Luego ensayamos si la inhibición de las  $I_{Ca}$  de los  $Ca_v$  depende de la cantidad de MC4R presente. Para diseñar este experimento nos basamos en que varios trabajos han demostrado que existe una correlación directa entre la cantidad de ADNc utilizado para transfectar células HEK293t y el nivel de expresión para el MC4R y otros GPCRs (Srinivasan *et al.*, 2004; Lopez Soto *et al.*, 2015). Así, en estos experimentos observamos una relación entre el nivel de inhibición de la  $I_{Ca}$  para los tres subtipos de  $Ca_v$  y la cantidad de ADNc de MC4R transfectado (figura 8), indicando que la cantidad de MC4R expresado influye en el nivel de inhibición de los  $Ca_v$ .



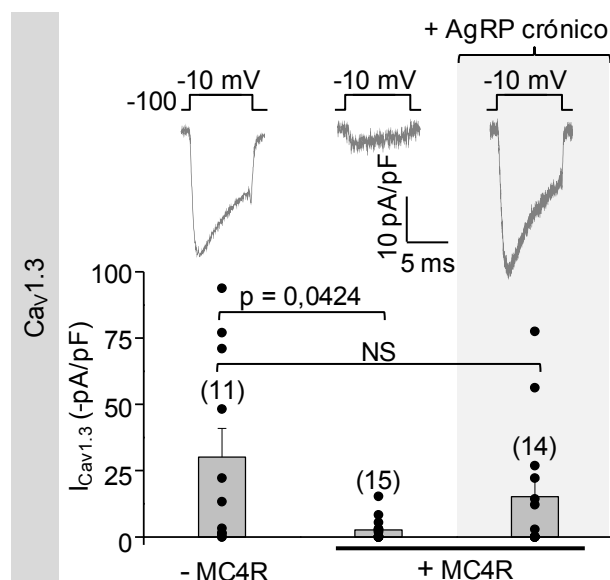
**Figura 8. El nivel de inhibición de la  $I_{Ca}$  de los  $Ca_v$  depende de la cantidad de MC4R presente en la célula.** Valores promedio (puntos grises) y valores individuales (puntos negros) de la  $I_{Ca}$  para células HEK293t expresando  $Ca_v1.3$  (A),  $Ca_v2.1$  (B) o  $Ca_v1.2$  (C) con cantidades crecientes de MC4R en las proporciones molares de plásmidos indicadas. Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 ó -10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas para cada condición.

Haciendo uso del AgRP, el agonista inverso endógeno del MC4R, confirmamos que la inhibición de las corrientes  $Ca_v$  se debe a la actividad constitutiva del MC4R y no a algún artefacto experimental. En primer lugar, registramos las  $I_{Ca}$  en células expresando el  $Ca_v1.3$  y el MC4R y aplicamos AgRP 100 nM de manera aguda. La densidad de  $I_{Ca}$  de las

células expresando  $\text{Ca}_v1.3$  y MC4R no varió con la aplicación aguda de AgRP, al menos durante 5 min de registro en tres  $I_{\text{Ca}}$  registradas (figura 9). Al encontrar que el AgRP no ejerce un efecto agudo sobre la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v1.3$ , decidimos probar el efecto de una incubación prolongada. Incubamos células HEK293t co-expresando  $\text{Ca}_v1.3$  y MC4R con AgRP 100 nM a partir de las 4 hs de transfección y hasta la realización de los registros de las  $I_{\text{Ca}}$ . Luego de las 44 hs de expresión con incubación de AgRP medimos la densidad de las  $I_{\text{Ca}}$  en las células transfectadas. Encontramos que las células incubadas con AgRP presentan una densidad de  $I_{\text{Ca}}$  similar a la condición sin MC4R (figura 10). Entonces, con el uso del agonista inverso del MC4R demostramos que la inhibición de los  $\text{Ca}_v$ , se debe a la actividad constitutiva del MC4R.



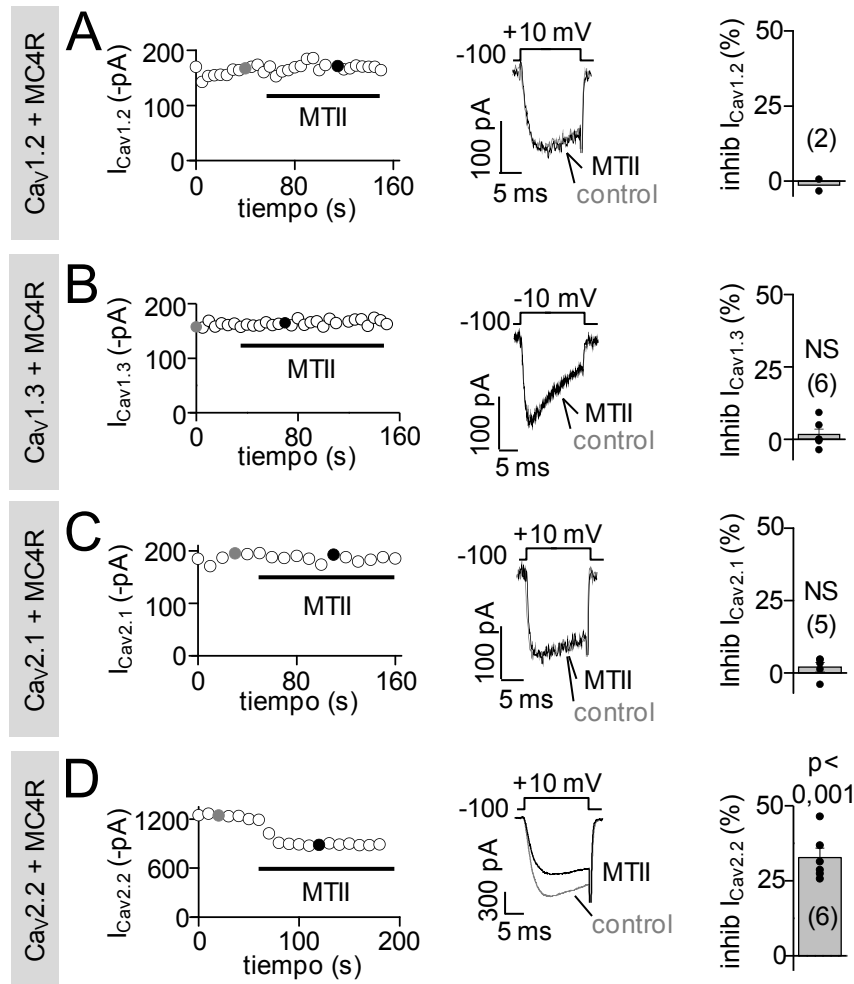
Por lo tanto, la actividad constitutiva del MC4R inhibe específicamente las  $I_{\text{Ca}}$  de los  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v2.1$  de manera dependiente de la cantidad de MC4R expresado, sin afectar a la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$ . Además, esta inhibición, al menos para el  $\text{Ca}_v1.3$  involucra un mecanismo a largo plazo. Como siguiente paso, decidimos estudiar el efecto de la activación del MC4R dependiente de agonista sobre las  $I_{\text{Ca}}$  de los distintos  $\text{Ca}_v$ .



**Figura 10. El efecto crónico de AgRP bloquea la actividad constitutiva del MC4R sobre Cav1.3.** Trazos representativos, valores promedio (barras) y valores individuales (puntos negros) de la  $I_{Ca}$  para células HEK293t expresando Cav1.3 sin (- MC4R) y con (+ MC4R) MC4R. Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje de -10 mV desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas. El panel gris indica la incubación por 44 hs con AgRP 100 nM.

## Efecto de la actividad dependiente de agonista del MC4R sobre la $I_{Ca}$ de cada subtipo de $Ca_v$

Para evaluar el efecto de la actividad dependiente de agonista del MC4R sobre los  $Ca_v$  utilizamos un agonista sintético de los receptores MC3R y MC4R, el MTII. El uso de MTII en lugar de  $\alpha$ -MSH (el agonista endógeno de MC4R) es preferible porque este último se degrada más fácilmente, y ambos tienen afinidades y eficiencias similares por el MC4R (Gao *et al.*, 2003). Para realizar los ensayos, aplicamos una concentración saturante del MTII (250 nM) (Ghamari-Langroudi *et al.*, 2011) en células HEK293t co-expresando MC4R y cada subtipo de  $Ca_v$  y registramos las  $I_{Ca}$ . En estos estudios encontramos que la aplicación aguda de MTII inhibe rápidamente la  $I_{Ca}$  del  $Ca_v2.2$  mientras que no produce ningún efecto sobre las corrientes de los  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  (figura 11). Como es de esperar, las corrientes mediadas por los  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  son de pequeña magnitud debido a la inhibición causada por la actividad constitutiva del MC4R. Sin embargo, en algunas células transfectadas, el nivel de corriente fue medible y pudo evaluarse el nivel de amplitud de las corrientes antes y después de la aplicación de este agonista observando la ausencia de efecto del MTII.

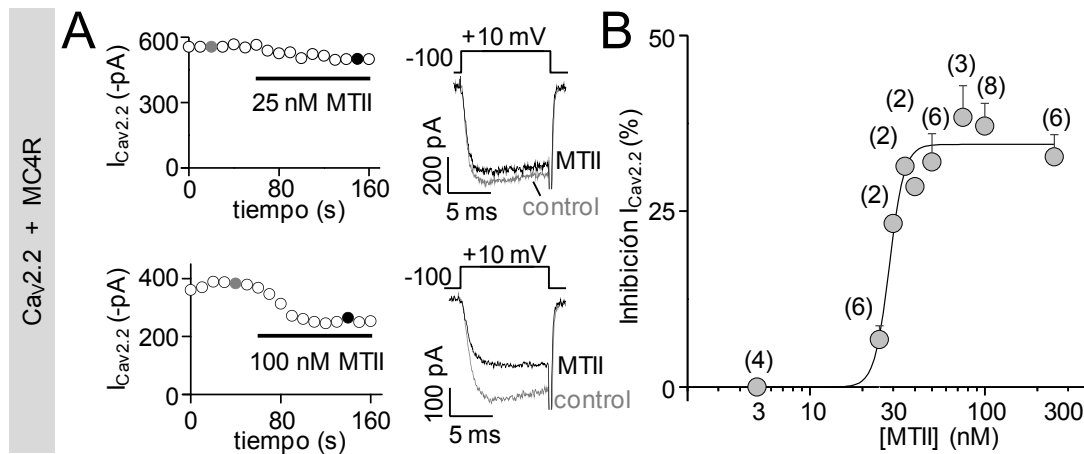


**Figura 11. La activación del MC4R evocada por MTII inhibe al  $\text{Ca}_V2.2$  sin afectar a los demás  $\text{Ca}_V$ .** Curso temporal (izquierda), trazos representativos (centro), valores promedio (derecha, barras) y valores individuales (derecha, puntos negros) del efecto de MTII 250 nM sobre la  $I_{\text{Ca}}$  al pico para  $\text{Ca}_V1.2$  (A),  $\text{Ca}_V1.3$  (B),  $\text{Ca}_V2.1$  (C) y  $\text{Ca}_V2.2$  (D) co-expresados en células HEK293t con MC4R. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{\text{Ca}}$  medidas para cada condición. Los puntos gris y negro del curso en el tiempo se corresponden a los trazos ejemplos mostrados.

Como observamos que la inhibición de los  $\text{Ca}_V$  por la actividad constitutiva del MC4R depende de la cantidad de receptor expresado, decidimos probar si la inhibición del  $\text{Ca}_V2.2$  por la actividad del MC4R dependiente de agonista también depende de la cantidad de receptor expresado. Para esto, transfectamos células HEK293t con  $\text{Ca}_V2.2$  y MC4R en proporción 1:0,25 molar. Registramos las  $I_{\text{Ca}}$  de células transfectadas y aplicamos MTII. Observamos una inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  de un  $40,23 \pm 6,4 \%$  ( $n = 6$ ). Valor

similar al de la inhibición en la condición 1:1 molar estudiada previamente en la figura 11D ( $p = 0,47$ ).

Luego, estudiamos la dependencia de la inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  con la concentración de MTII utilizada. Realizamos una curva de concentración de MTII *versus* % de inhibición de las  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  (figura 12), ensayando concentraciones de MTII desde 5 hasta 250 nM. Al ajustar los datos individuales obtenidos con una ecuación de Hill, encontramos que la concentración efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ ) del MTII es de  $28,4 \pm 1,2$  nM y la inhibición máxima de la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  es de un  $34,5 \pm 1,5$  %. Realizamos controles en los que aplicamos MTII 250 nM en células expresando  $\text{Ca}_v2.2$  sin MC4R y observamos ausencia de inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  ( $1,50 \pm 1,7$  %; NS de cero,  $p = 0,4$ ;  $n = 5$ ). Además, evaluamos el efecto de la actividad del MC3R evocada por MTII sobre  $\text{Ca}_v2.2$ , sin encontrar efecto sobre la  $I_{\text{Ca}}$  ( $6,5 \pm 7.3$  %; NS de cero,  $p = 0,4$ ;  $n = 9$ ).



De acuerdo con nuestros resultados, la actividad del MC4R dependiente de MTII inhibe específicamente la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  sin afectar las corrientes de los  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v2.1$ . Así mismo, esta inhibición es dependiente de la concentración del agonista y parecería saturar a bajas cantidades del MC4R expresado.



Hasta aquí, el sistema de expresión heteróloga HEK293t nos permitió estudiar de manera específica y aislada la interacción entre el MC4R y los distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$ . En un siguiente paso estudiamos esta interacción en condiciones celulares más cercanas a las fisiológicas. Para esto utilizamos cultivos primarios de neuronas de amígdala, donde se expresa tanto el MC4R, como los  $\text{Ca}_v$  (Lee *et al.*, 2002; Kishi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003).

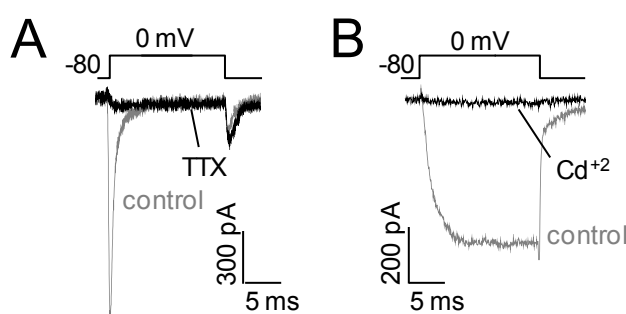
### Efecto de la inhibición de los $\text{Ca}_v$ por la actividad del MC4R dependiente de agonista en cultivos primarios de amígdala

En esta sección estudiamos la interacción entre el MC4R y los  $\text{Ca}_v$  nativos en cultivos primarios neuronales. Los cultivos primarios de neuronas constituyen modelos ampliamente utilizados para estudios de mecanismos celulares en neurociencia, dado que las neuronas en cultivo pueden presentar propiedades muy similares a las que poseen en su contexto natural con la ventaja de estar en un medio controlado y manipulable.

En estos cultivos, tanto el MC4R como todos los distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$  están expresados a niveles fisiológicos bajo el control de sus promotores nativos. En este modelo intentamos reproducir nuestros datos de la inhibición de los  $\text{Ca}_v$  por la actividad del MC4R. Utilizamos como material de partida la sección del cerebro comprendida por la amígdala de embriones de ratón entre los días embrionarios 16 y 18. Registramos las corrientes de neuronas de cultivos primarios de entre 6 y 28 días en cultivo. Seleccionamos las neuronas a registrar por su morfología (soma y neurita/s distinguibles) y por la presencia de corrientes de sodio ( $I_{\text{Na}}$ ) registradas por pulsos despolarizantes de -80 a 0 mV. Ensayamos además que estas  $I_{\text{Na}}$  fueran inhibidas completamente por tetrodotoxina (TTX) 1  $\mu\text{M}$  (figura 13A), indicando que corresponden a corrientes a través de los canales de sodio operados por voltaje ( $\text{Na}_v$ ) responsables de la generación de potencial de acción neuronal (Hille, 2001).

En las mismas neuronas donde registramos las  $I_{\text{Na}}$ , medimos las corrientes a través de los  $\text{Ca}_v$ . A diferencia de los experimentos con el sistema heterólogo donde los  $\text{Ca}_v$  son sobre-expresados bajo la regulación de promotores fuertes, en las neuronas los promotores reguladores de la expresión de los  $\text{Ca}_v$  son los nativos, por lo que la expresión

de los  $\text{Ca}_V$  en neuronas es mucho menor y es necesaria una amplificación de la corriente para poder estudiarlos de una manera más confiable. Por lo tanto, aquí utilizamos una solución externa conteniendo el ion  $\text{Ba}^{+2}$  (10 mM) en reemplazo del ion  $\text{Ca}^{+2}$ , debido a que los  $\text{Ca}_V$  presentan una permeabilidad mayor para el  $\text{Ba}^{+2}$  que para el  $\text{Ca}^{+2}$  y, por lo tanto, las corrientes se ven amplificadas (Hagiwara *et al.*, 1974; Bourinet *et al.*, 1996; Hille, 2001). En estas condiciones obtuvimos corrientes de  $\text{Ba}^{+2}$  ( $I_{\text{Ba}}$ ) de amplitud apreciable y estas fueron completamente inhibidas por la aplicación de  $\text{CdCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  (figura 13B), un bloqueador general de los  $\text{Ca}_V$ , indicándonos que las  $I_{\text{Ba}}$  se deben sólo a la activación de los  $\text{Ca}_V$ .

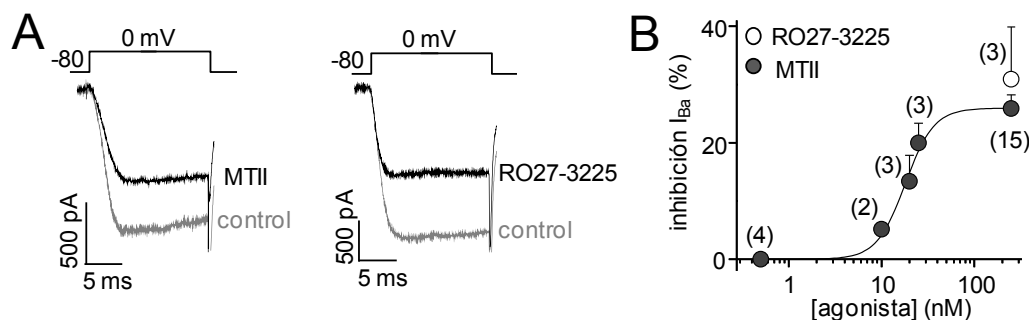


**Figura 13. Caracterización de las  $I_{\text{Na}}$  y  $I_{\text{Ba}}$  en neuronas de cultivos primarios de amígdala.** **A**, trazos representativos de una  $I_{\text{Na}}$  en condición control y luego de la aplicación de TTX 1  $\mu\text{M}$  de neuronas de amígdala en cultivo. **B**, trazos representativos de una  $I_{\text{Ba}}$  en condición control y luego de la aplicación de  $\text{Cd}^{+2}$  100  $\mu\text{M}$  de neuronas de amígdala en cultivo.

Una vez establecidas las propiedades de las corrientes  $\text{Ca}_V$  nativas de las neuronas de la amígdala en nuestras condiciones de trabajo ensayamos el efecto de MTII. Encontramos que el 88% de las  $I_{\text{Ba}}$  registradas en estas neuronas se inhibieron ante la aplicación de MTII en concentración saturante (250 nM), indicando la presencia del MC4R en un alto porcentaje de las neuronas en cultivo y confirmando que la modulación observada en el sistema heterólogo de expresión tiene lugar también en un contexto neuronal con el receptor y los  $\text{Ca}_V$  expresados de manera nativa.

Posteriormente, realizamos experimentos para establecer la especificidad del efecto de MTII sobre las  $I_{\text{Ba}}$ . Dado que el MTII también es agonista del MC3R decidimos estudiar a concentraciones saturantes un agonista sintético específico del MC4R, el RO27-3225 (250 nM) (Benoit *et al.*, 2000) para eliminar la posibilidad de que el efecto de MTII encontrado no fuera específico en neuronas. Observamos que este agonista inhibe las corrientes  $\text{Ca}_V$  con un porcentaje de inhibición similar al del MTII,  $30,88 \pm 9,0$  % (NS de la inhibición máxima por MTII 250 nM,  $p = 0,73$ ) (figura 14A y B) sugiriendo un efecto específico del MTII. Además, ensayamos el efecto de MTII sobre las  $I_{\text{Na}}$  y no observamos ningún cambio en la corriente: inhibición del  $5,9 \pm 3,1$  % (NS de cero,  $p = 0,13$ ;  $n = 5$ ).

Luego, realizamos una curva de concentración de MTII en el rango desde 5 a 250 nM *versus* el % de inhibición de las  $I_{Ba}$  y, ajustando los datos a una ecuación de Hill, calculamos el EC50 para el MTII=  $18,0 \pm 3,7$  nM (figura 14B); y la inhibición máxima de la  $I_{Ba}$  alcanzada=  $25,9 \pm 2,0$  % (figura 14 B).

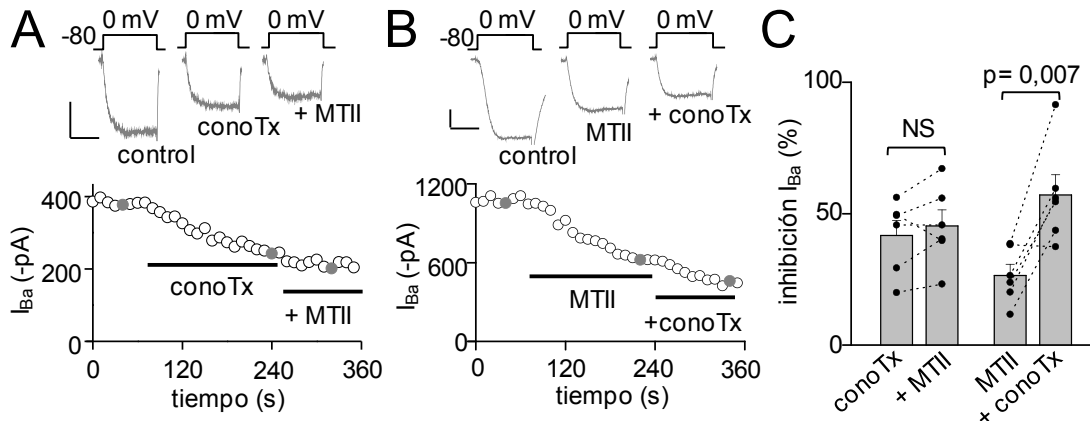


**Figura 14. La activación del MC4R por agonistas inhibe las  $I_{Ba}$  neuronales.** **A**, trazos representativos de  $I_{Ba}$  en condiciones control y con la aplicación de agonistas de MC4R: MTII 250 nM (izq) y RO27-3225 250 nM (der). **B**, valores promedio del % de inhibición de la  $I_{Ba}$  *versus* la concentración de MTII y RO27-3225. La línea representa la curva obtenida con el ajuste de los datos a una ecuación de Hill ( $r^2 = 0,62$ ). Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas para cada concentración de agonista.

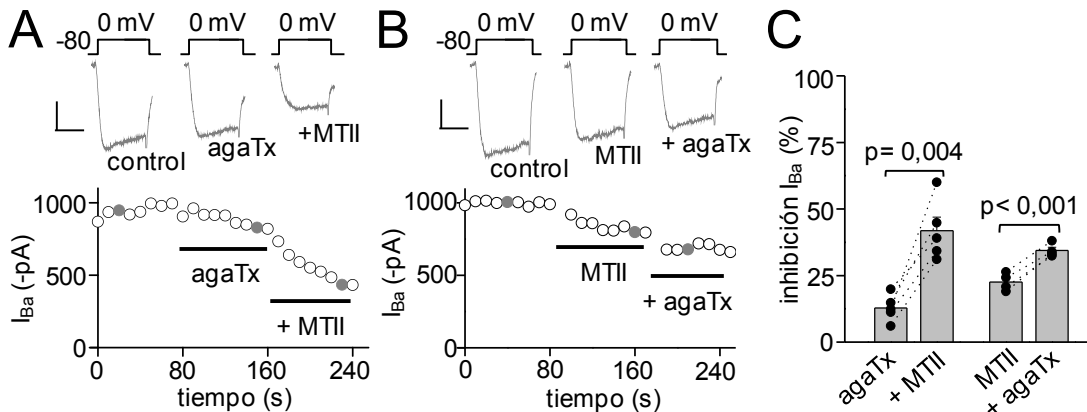
Las neuronas expresan una variedad de distintos subtipos de  $Ca_v$ , por lo que al medir las  $I_{Ba}$  y ensayar el efecto de la aplicación de MTII, se mide la inhibición sobre la corriente total de todos los  $Ca_v$  activados por el estímulo de voltaje. Dado que en células HEK293t encontramos que la activación del MC4R por MTII sólo inhibe el subtipo  $Ca_v2.2$ , en cultivos neuronales ensayamos la inhibición de las corrientes aisladas de este  $Ca_v$  mediante el uso de la toxina que bloquea específicamente a los  $Ca_v2.2$ :  $\omega$ -conotoxina GVIA (conoTx). Al aplicar conoTx 1  $\mu$ M a la  $I_{Ba}$  total, la misma se inhibe en un  $41,7 \pm 5,7$  %. Luego, aun en presencia de conoTx, aplicamos MTII 250 nM y no observamos inhibición de la  $I_{Ba}$  remanente (figura 15A y C). De manera inversa, en neuronas independientes, aplicamos en primer lugar MTII 250 nM, observamos la inhibición de la  $I_{Ba}$ , y luego, aun en presencia de MTII, aplicamos conoTx. En este caso, la aplicación de MTII y conoTx produce una inhibición similar a la que se alcanza con la aplicación solo de conoTx (NS,  $p = 0,13$ ) (figura 15B y C).

A modo de control, decidimos estudiar si el efecto de MTII no involucra también a los canales pre-sinápticos  $Ca_v2.1$ . Si la activación por agonista del MC4R inhibe específicamente los  $Ca_v2.2$ , el bloqueo de otros subtipos de  $Ca_v$  no debería afectar la inhibición de la  $I_{Ba}$  producida por la aplicación de MTII. Utilizamos la toxina que bloquea específicamente los  $Ca_v2.1$ ,  $\omega$ -agatoxina IVA (agaTx) en concentración 0,1  $\mu$ M. Como

muestra en la figura 16, MTII inhibe la  $I_{Ba}$  en ambos casos, aplicado en primer o segundo lugar con respecto a la toxina. Indicando que la corriente  $Ca_v2.1$  no es modificada por la aplicación de MTII en neuronas de amígdala en cultivo.



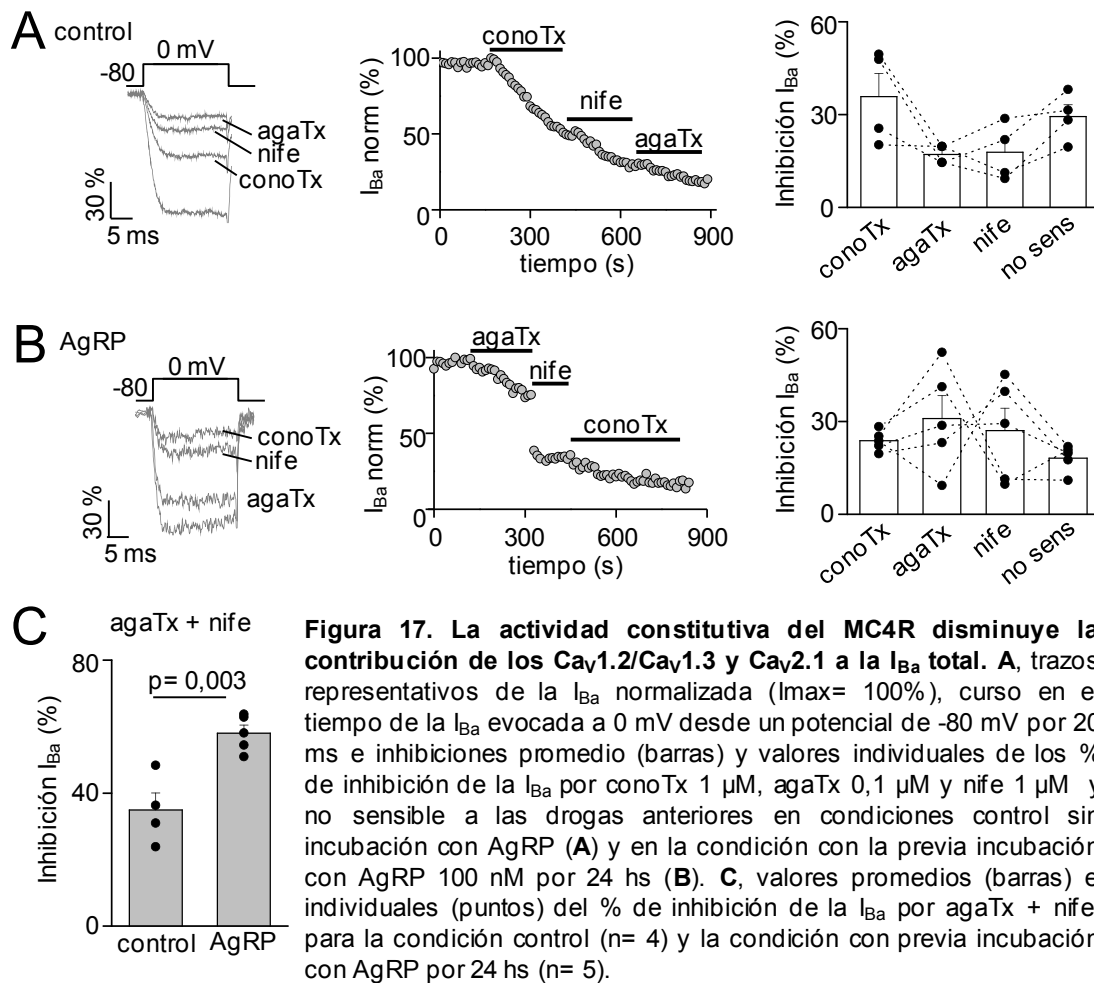
**Figura 15. MTII inhibe la  $I_{Ba}$  del  $Ca_v2.2$  en neuronas en cultivo.** **A**, trazos representativos y curso en el tiempo de la  $I_{Ba}$  evocada a 0 mV desde un potencial de -80 mV por 20 ms en condiciones control, con la aplicación de conoTx 1  $\mu$ M y la aplicación de MTII 250 nM sobre conoTx. **B**, lo mismo descrito para A pero invirtiendo el orden de aplicación de las drogas. **C**, valores promedio (barras) y valores individuales (puntos negros) de la inhibición de la  $I_{Ba}$  por conoTx (conoTx), y conoTx mas MTII (+MTII), y por MTII (MTII) y MTII mas conoTx (+conoTx) ( $n = 6$   $I_{Ba}$  registradas para cada experimento). Las líneas de escala corresponden a: 10 ms; 200 pA. Los puntos grises del curso en el tiempo se corresponden a los trazos ejemplos mostrados.



**Figura 16. MTII no afecta la  $I_{Ba}$  del  $Ca_v2.1$  en neuronas en cultivo.** **A**, trazos representativos y curso en el tiempo de la  $I_{Ba}$  evocada a 0 mV desde un potencial de -80 mV por 20 ms en condiciones control, con la aplicación de agaTx 0,1  $\mu$ M y luego la aplicación de MTII 250 nM sobre agaTx. **B**, lo mismo descrito para A pero invirtiendo el orden de aplicación de las drogas. **C**, valores promedio (barras) y valores individuales (puntos negros) de la inhibición de la  $I_{Ba}$  por agaTx (agaTx), y agaTx mas MTII (+MTII), y por MTII (MTII) y MTII mas agaTx (+agaTx) ( $n = 4$  y  $n = 3$  corrientes registradas, respectivamente). Las líneas de escala corresponden a: 10 ms; 300 pA. Los puntos negros del curso en el tiempo se corresponden a los trazos ejemplos mostrados.

Entonces, en esta sección logramos recapitular en neuronas en cultivo, los datos obtenidos en las células HEK293t, demostrando que la actividad del MC4R evocada por MTII inhibe únicamente los  $\text{Ca}_v2.2$  en neuronas. Luego decidimos estudiar si la inhibición de los  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v2.1$  por la actividad constitutiva del MC4R se reproduce en neuronas de amígdala en cultivo.

## Efecto de la inhibición de los $\text{Ca}_v$ por la actividad constitutiva del MC4R en cultivos primarios de amígdala



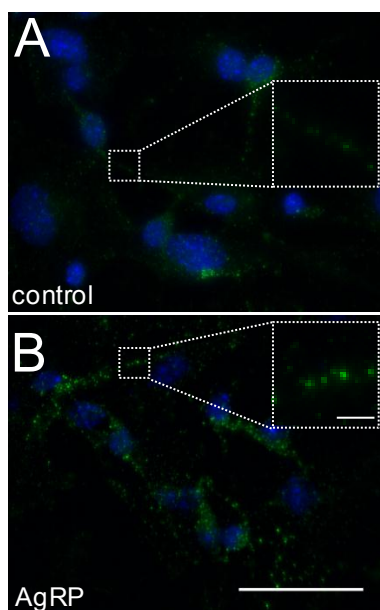
Al comparar los porcentajes de inhibición de la  $I_{Ba}$  total por conoTx y agaTx en la sección anterior observamos que la contribución de los  $\text{Ca}_v2.2$  a la corriente total es mucho mayor que la de  $\text{Ca}_v2.1$ . Este dato, nos llevó a pensar que la actividad constitutiva del MC4R podría estar inhibiendo basalmente a las  $I_{Ba}$  de los  $\text{Ca}_v2.1$ , y también

posiblemente a las de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  en neuronas en cultivo, tal como previamente lo observamos en células HEK293t. Para estudiar esta posibilidad, utilizamos cultivos primarios neuronales de amígdala e inhibimos la actividad constitutiva del MC4R con su agonista inverso, AgRP. Incubamos las neuronas durante 24 hs con AgRP 100 nM y luego registramos las  $I_{Na}$  y las  $I_{Ba}$ . Para estudiar la contribución de cada subtipo de  $\text{Ca}_v$  a la  $I_{Ba}$ , utilizamos bloqueadores específicos de cada subtipo de  $\text{Ca}_v$ . Utilizamos conoTx 1  $\mu\text{M}$  para bloquear los  $\text{Ca}_v2.2$ , agaTx 0,1  $\mu\text{M}$  para bloquear los  $\text{Ca}_v2.1$  y nifedipina (nife) 1  $\mu\text{M}$  para inhibir los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$ . La  $I_{Ba}$  remanente se consideró como la  $I_{Ba}$  no sensible a la inhibición por conoTx, agaTx, ni nife. Al realizar los experimentos observamos que los porcentajes de inhibición por cada droga cambian con la incubación de las neuronas con AgRP (figura 17). Observamos que el % de la  $I_{Ba}$  inhibida por agaTx + nife fue mayor en las neuronas tratadas con AgRP que en la condición control (sin incubación con AgRP) (figura 17C). Entonces, la actividad constitutiva del MC4R estaría inhibiendo las  $I_{Ba}$  de los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v2.1$  en neuronas de amígdala en cultivo.

### Efecto de la actividad constitutiva del MC4R en la localización del $\text{Ca}_v2.1$ en neuronas de amígdala en cultivo.

Los  $\text{Ca}_v2.1$  se localizan principalmente en la pre-sinapsis. Entonces, si la incubación de neuronas en cultivo con AgRP, aumenta la contribución de los  $\text{Ca}_v2.1$  a la corriente total, nosotros postulamos que AgRP debería aumentar también el número de los  $\text{Ca}_v2.1$  en la pre-sinapsis. Para ensayar esta hipótesis realizamos una inmunocitoquímica contra el  $\text{Ca}_v2.1$  en neuronas de amígdala en cultivo pre-incubadas o no con AgRP. Al quinto día de cultivo agregamos AgRP 100 nM al medio de cultivo y luego de 24 hs fijamos las células y realizamos la inmunocitoquímica contra el  $\text{Ca}_v2.1$ . Al comparar cualitativamente las microfotografías obtenidas en las dos condiciones experimentales (neuronas control sin incubación con AgRP y neuronas incubadas por 24 hs con AgRP), observamos mayor intensidad de señal punteada en la condición donde las neuronas fueron incubadas con AgRP (figura 18). La señal en forma de *puncta* (puntos en latín) generalmente se relaciona con la localización pre-sináptica de la proteína en estudio (Raingo *et al.*, 2012). Entonces, este ensayo preliminar podría indicar que la inhibición de la actividad

constitutiva del MC4R aumentaría la cantidad del  $\text{Ca}_v2.1$  en las sinapsis de neuronas de amígdala en cultivo.



**Figura 18. El bloqueo de la actividad constitutiva del MC4R aumenta la presencia de  $\text{Ca}_v2.1$  en la pre-sinapsis.**

Microfotografías representativas de neuronas de amígdala en cultivo sin tratar (**A**) o tratadas por 24 hs con AgRP 100 nM (**B**). Se realizó una inmunocitoquímica contra  $\text{Ca}_v2.1$  (marca verde) y la marca azul indica núcleos celulares teñidos por el compuesto Hoechst. La barra de escala indica 50  $\mu\text{M}$  para ambas microfotografías. Los cuadrados grandes muestran en mayor aumento lo que se observa en los cuadrados pequeños (barra de escala= 5  $\mu\text{M}$ ).

## Capítulo 2:

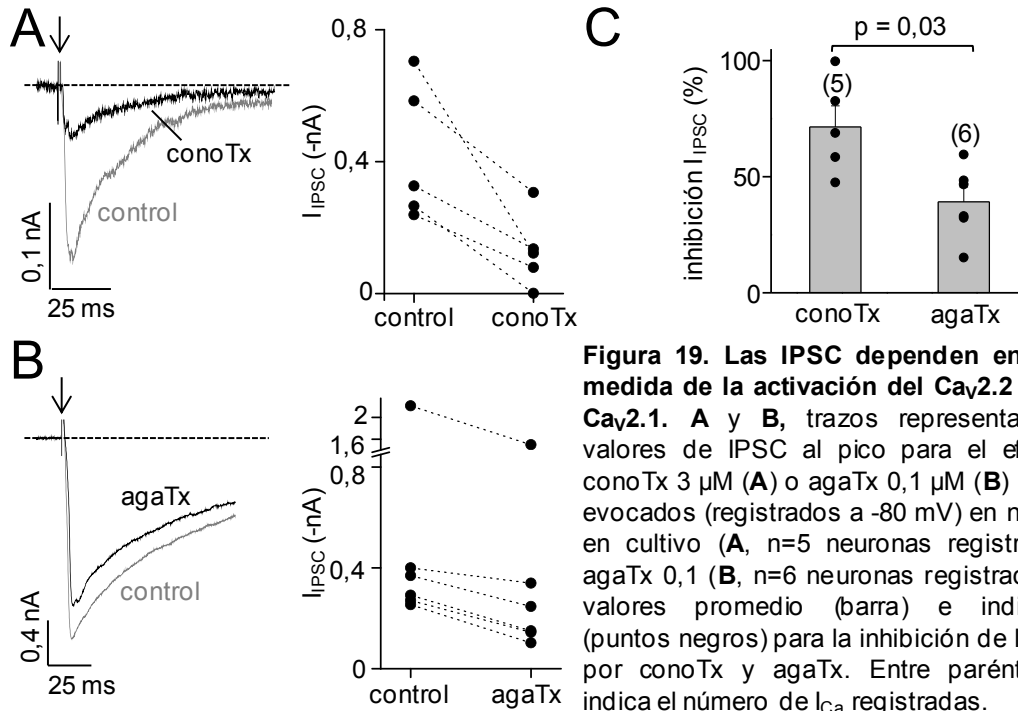
Impacto sobre la actividad neuronal por la inhibición de los  $Ca_v$  mediada por la actividad del MC4R



## Efecto en la liberación de neurotransmisores de neuronas de la amígdala por la activación del MC4R dependiente de agonista

La activación dependiente de agonista del MC4R, produce el aumento de la actividad neuronal en la amígdala (Thiele *et al.*, 1998; Benoit *et al.*, 2000); y los  $\text{Ca}_v2.2$  se localizan mayoritariamente en la pre-sinapsis regulando la liberación de NT. Como nosotros encontramos una inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  por la activación del MC4R, planteamos la hipótesis de que este efecto podría disminuir la liberación de GABA contribuyendo a la activación post-sináptica de las neuronas de la amígdala. Para ensayar esta hipótesis, utilizamos cultivos primarios de neuronas de amígdala de ratón a partir del día 13 en cultivo donde las neuronas alcanzan un estadio de madurez sináptico, con conexiones tipo sinápticas entre ellas y morfología ramificada. Para realizar una caracterización general del cultivo registramos las corrientes inhibitorias post-sinápticas (IPSC, del inglés *inhibitory post-synaptic currents*) y evaluamos la dependencia de las mismas con la activación de los  $\text{Ca}_v2.2$  y  $\text{Ca}_v2.1$  utilizando la técnica de *patch-clamp* en configuración célula entera. Las IPSC son corrientes post-sinápticas que se generan por la activación de receptores  $\text{GABA}_A$  presentes en la post-sinapsis. Para medirlas, estimulamos los cultivos con un campo eléctrico generado entre dos electrodos de platino. Medimos la corriente evocada por estos pulsos en presencia de un antagonista de receptores AMPA, el 6-ciano-7-nitro quinoxalina-2,3-diona (CNQX), para aislar la contribución GABAérgica a la corriente post-sináptica total. No fue necesario el agregado del inhibidor de receptores NMDA debido a que la aplicación de CNQX y de un bloqueador de los receptores  $\text{GABA}_A$ , picrotoxina, inhibió la totalidad de las IPSC en 7 de 7 neuronas estudiadas. Como mostramos en la figura 19, medimos la inhibición de la amplitud de las IPSC provocada por la aplicación de conoTx ( $71,4 \pm 9,1$  %) y agaTx ( $39,2 \pm 6,4$  %). Estos resultados nos sugieren que las  $I_{Ca}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  tienen una mayor participación en evocar la liberación de GABA que las del  $\text{Ca}_v2.1$  en nuestro sistema de estudio. Además, la aplicación de ambas toxinas inhibió la totalidad de las IPSC ( $93,23 \pm 3,43$  %,  $n = 3$ ; NS de 100 %;  $p = 0,19$ ). Luego, utilizamos MTII para evaluar si el efecto inhibitorio de la activación del MC4R sobre los  $\text{Ca}_v2.2$  se refleja en una menor liberación de GABA. Aplicamos MTII 250 nM sobre las IPSC registradas y observamos una inhibición de la amplitud de las IPSC de un  $55,4 \pm 14,4$  % (figura 20). Estos resultados nos indican que la activación del MC4R por agonista reduce el tamaño de las IPSC evocadas por despolarización, posiblemente a

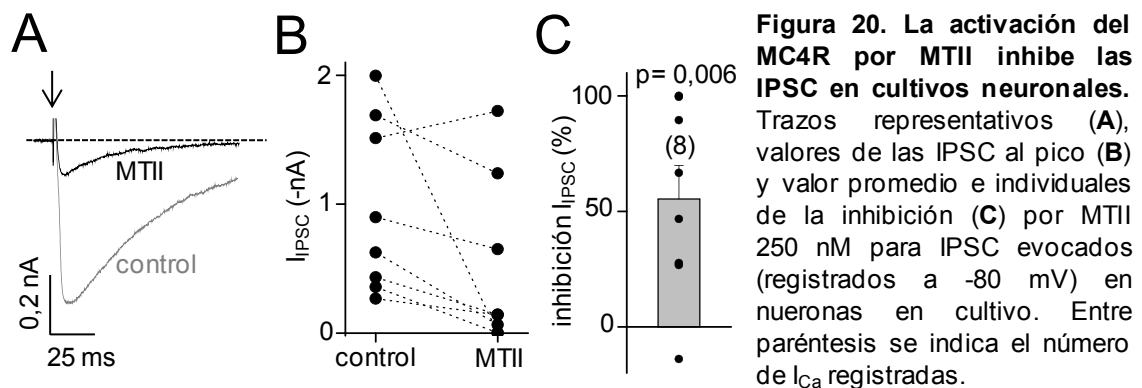
través de la disminución de las corrientes  $\text{Ca}_v2.2$  y la consecuente inhibición de la liberación de GABA.



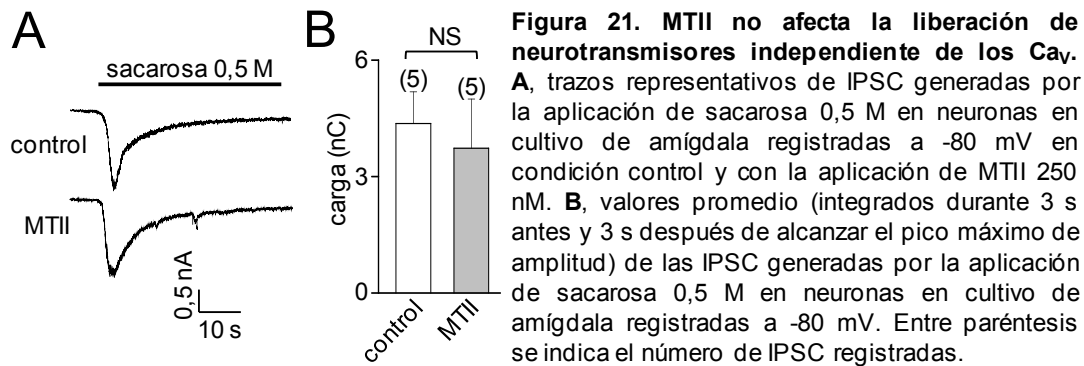
Para descartar la contribución de una modulación pre-sináptica distinta a la inhibición de los  $\text{Ca}_v2.2$ , utilizamos una solución de registro con sacarosa 0,5 M que causa liberación de NT en forma totalmente independiente de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la terminal sináptica (Rosenmund & Stevens, 1996; Raingo *et al.*, 2012). Nosotros registramos la corriente neuronal post-sináptica a -80 mV durante la aplicación de sacarosa 0,5 M con o sin MTII 250 nM y encontramos que el agregado de MTII no modifica la corriente GABAérgica estimulada por una solución de sacarosa 0,5 M (figura 21).

Asimismo, ensayamos si el efecto inhibitorio del MTII sobre las IPSC se debe a un mecanismo completamente pre-sináptico dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ . Para esto, registramos IPSC miniatura (mIPSC) que son corrientes GABAérgicas pequeñas producidas por la fusión de vesículas sinápticas en forma independiente de los potenciales de acción. El cambio en la frecuencia de las mIPSC depende de mecanismos pre-sinápticos ya que se relaciona con la frecuencia de fusión de vesículas para liberar NT desde las pre-sinapsis pero no involucra a los  $\text{Ca}_v$  porque son medidas en presencia de

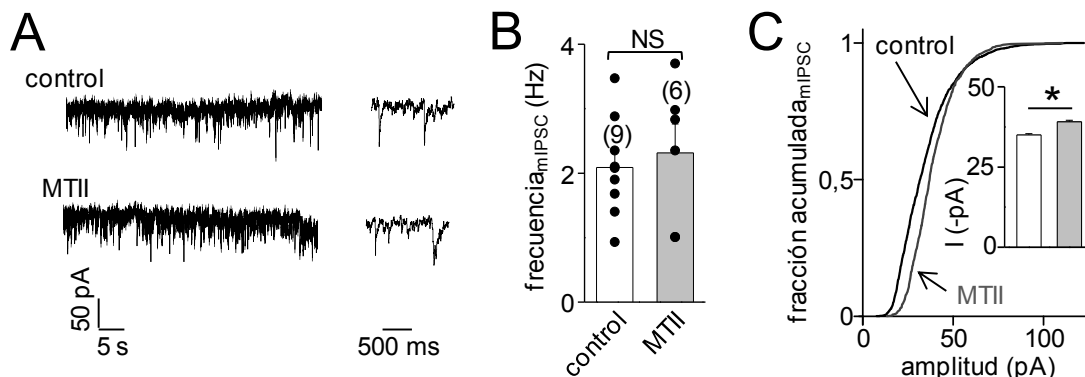
TTX que bloquea los potenciales de acción que puedan activar los  $\text{Ca}_v$  pre-sinápticos. En cambio, la variación en la amplitud de las mIPSC depende de mecanismos post-sinápticos porque involucran el aumento de sensibilidad de los receptores  $\text{GABA}_A$  localizados en la membrana post-sináptica, o un aumento del número de estos receptores. Nosotros encontramos que la frecuencia de las mIPSC no varía con la aplicación de MTII, mientras que la amplitud aumenta en un pequeño porcentaje (figura 22). Estos resultados sugieren que el efecto de la inhibición de las IPSC por MTII no involucra un mecanismo pre-sináptico independiente de los  $\text{Ca}_v$  y tendría un leve efecto post-sináptico.



Dado que en neuronas de amígdala también son importantes las sinapsis glutamatergicas (Neugebauer, 2015), decidimos explorar si el MC4R es capaz de modular las corrientes post-sinápticas excitatorias (EPSC, del inglés *excitatory post-synaptic current*) lideradas por la activación de receptores glutamatergicos. Para esto, registramos las corrientes evocadas en presencia de picrotoxina, un antagonista de los receptores  $\text{GABA}_A$ , para aislar las corrientes glutamatergicas. Encontramos que la aplicación de MTII no modifica el tamaño de las EPSC en los cultivos neuronales ( $17,8 \pm 14,4$  %,  $n = 5$ , NS de cero,  $p = 0.3$ ).



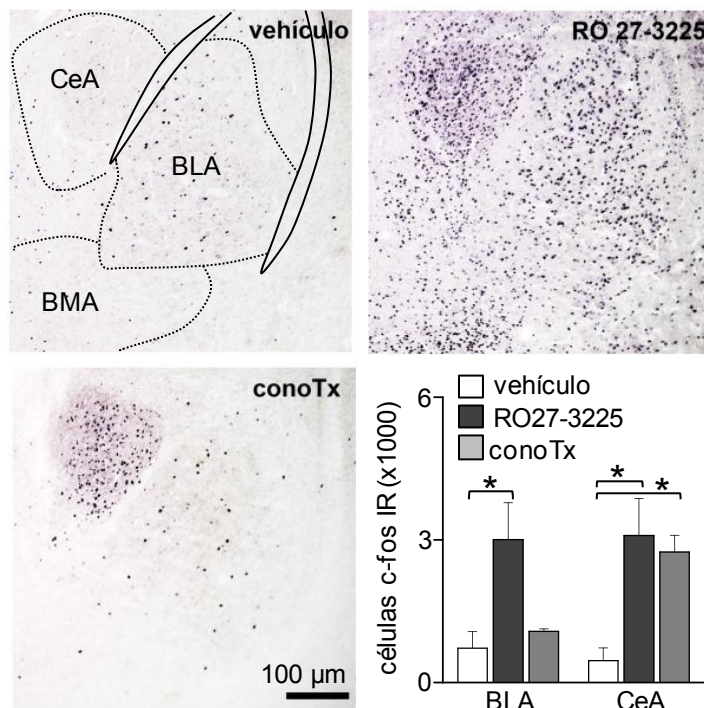
Hasta aquí encontramos que la inhibición del  $Ca_v2.2$  por la activación del MC4R dependiente de MTII es relevante en neuronas de la amígdala, donde este efecto disminuye la amplitud de las IPSC. Es un mecanismo completamente pre-sináptico y dependiente de los  $Ca_v$ . A continuación, decidimos estudiar si este mecanismo se ajusta a la acción *in vivo* de un agonista del MC4R utilizando ratones como modelo de estudio.



## Dependencia de la activación neuronal con la inhibición del $Ca_v2.2$ por la activación del MC4R dependiente de agonista

De acuerdo a los resultados expuestos previamente, nosotros postulamos que la reducción de las IPSC mediada por la activación del MC4R puede mediar la activación de

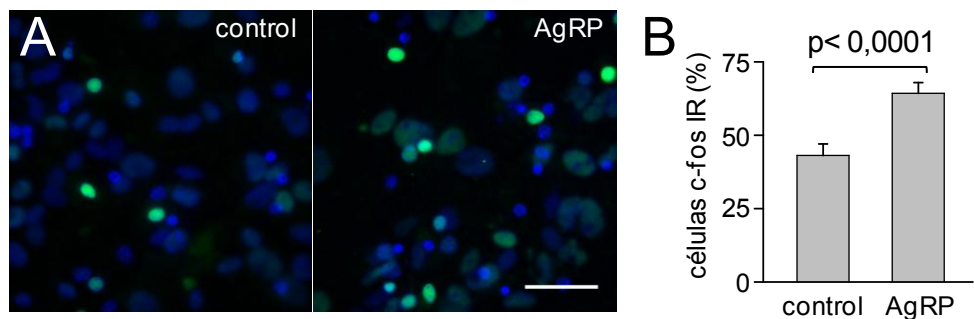
las neuronas de la amígdala descrita previamente (Benoit *et al.*, 2000). Para estudiar esto, realizamos experimentos *in vivo* donde evaluamos la inducción de la transcripción del marcador de activación neuronal, c-fos, frente a distintos estímulos: inyecciones intra-cerebro-ventriculares (icv) de un agonista específico del MC4R, RO27-3225; e inyecciones icv del bloqueador de los  $Ca_v2.2$  (conoTx). Como se ve en la figura 23, al inyectar RO27-3225 icv, encontramos que se produce un intenso aumento en el número de células inmuno-reactivas contra c-fos (c-fos-IR) en la amígdala central (CeA) y la basolateral (BLA), comparado con el número de células c-fos-IR observado para los ratones inyectados con vehículo. En contraste, vimos que conoTx induce un aumento de células c-fos-IR exclusivamente en la CeA (figura 23). Entonces, el bloqueo de los  $Ca_v2.2$  reproduce el patrón de expresión de c-fos inducido por el agonista del MC4R solo en la CeA, donde la innervación GABAérgica es particularmente abundante (Roberto *et al.*, 2003; Pare *et al.*, 2004; Jovanovic & Ressler, 2010).



**Figura 23. ConoTx reproduce el mismo patrón de células c-fos positivas que RO27-3225 en la CeA.** Microfotografías representativas de cortes coronales de cerebro de ratón. Se muestra la zona comprendida por la amígdala. Se realizó una inmuno-histoquímica contra c-fos (señal negra/púrpura) de ratones tratados con vehículo, RO27-3225 y conoTx. En el primer cuadrante se observa un diagrama esquemático de las distintas sub-regiones de la amígdala. El último panel muestra la cuantificación de células positivas para c-fos en las sub-regiones BLA y CeA.

Dependencia de la activación neuronal con la des-inhibición de los  $Ca_v1.2/Ca_v1.3$  por el bloqueo de la actividad constitutiva del MC4R

Como nosotros vimos que el AgRP modifica el % de corriente de  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$  que contribuye a la corriente total en cultivos neuronales de amígdala, decidimos estudiar si este efecto también produce un aumento de la activación de la expresión génica mediada por estos canales, la cual es un eje fundamental en la funcionalidad de estos  $\text{Ca}_v$ . Para esto, examinamos el efecto de la incubación con AgRP sobre la expresión de un factor de activación neuronal evocada por la acción del agonista de los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$ , (S)-(-)Bay K8644 (BayK). Se conoce que el BayK estimula la transcripción del gen temprano de activación neuronal, c-fos, al activar los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$  en neuronas (Morgan & Curran, 1986). Realizamos cultivos primarios de amígdala y los incubamos con AgRP o vehículo durante 24 hs. Luego, tratamos ambos grupos con BayK 1  $\mu\text{M}$ . Después de 2 hs de tratamiento, fijamos las células para cuantificar el % de neuronas positivas para c-fos mediante inmunocitoquímica. Observamos que en neuronas incubadas con AgRP la estimulación de los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$  con BayK aumentó significativamente el % de neuronas c-fos-IR con respecto a la condición control (figura 24). También realizamos como control el conteo de las células c-fos-IR en condición control y con AgRP sin estimulación con BayK. En estas condiciones, el % de células c-fos-IR fue similar (control=  $57,06 \pm 3,45$  %; AgRP=  $56,43 \pm 3,06$ , NS entre sí,  $p > 0,05$ ), sugiriendo que el AgRP es capaz de activar la expresión de c-fos sólo cuando se estimulan las  $I_{\text{Ca}}$  de los  $\text{Ca}_v1$ . Si bien es un estudio preliminar debido a que lo realizamos solo una vez, el resultado sugiere que al estimular con BayK todos los  $\text{Ca}_v1$  presentes en la membrana plasmática, la activación neuronal es mayor cuando la actividad constitutiva del MC4R es inhibida por AgRP.



**Figura 24. AgRP aumenta la expresión de c-fos por la estimulación de los  $\text{Ca}_v1.2/\text{Ca}_v1.3$ .** **A**, microfotografías representativas de cultivos neuronales de amígdala donde se realizó una inmunocitoquímica contra c-fos (señal verde) y se observan los núcleos celulares teñidos con Hoechst (señal azul). Los cultivos fueron incubados (AgRP) o no (control) con AgRP 100 nM por 24 hs; y fueron estimulados con BayK 1  $\mu\text{M}$ . durante 2 hs. **B**, porcentajes de neuronas con señal positiva para c-fos en relación a la cantidad de neuronas totales en condiciones control o con previa incubación con AgRP, y tratadas con BayK. Barra de escala= 50  $\mu\text{m}$ .

## Capítulo 3:

Vías intracelulares involucradas en la inhibición de los  $\text{Ca}_v$  por la activación del MC4R

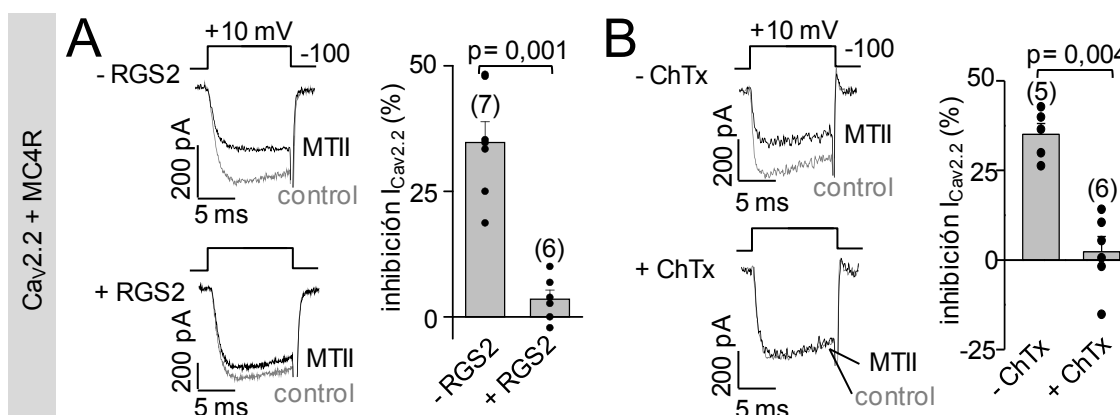


## Cascadas intracelulares involucradas en la inhibición del $\text{Ca}_v2.2$ por la actividad del MC4R dependiente de agonista

### - Vía de proteína G involucrada en la inhibición del $\text{Ca}_v2.2$ por la actividad dependiente de agonista del MC4R

Para estudiar la vía de proteína G utilizada por el MC4R para inhibir el  $\text{Ca}_v2.2$  utilizamos primero la sobre-expresión de un fragmento de una proteína reguladora de la señalización de proteína G (RGS, del inglés, *regulator of G-protein signaling*), RGS2, que interviene en las vías de señalización de diversas proteínas G (Heximer *et al.*, 1997; Kehrl & Sinnarajah, 2002; Han *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2006). Co-expresamos RGS2 en células HEK293t junto con el  $\text{Ca}_v2.2$  y el MC4R en proporción 1:1:1 molar. Registramos las  $I_{\text{Ca}}$  de las células transfectadas y aplicamos MTII 250 nM sobre ellas. Encontramos que el MTII no inhibe las  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  en presencia de RGS2 (NS de cero,  $p=0,10$ ) (figura 25A). Lo que indica que la inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  mediada por la activación del MC4R depende de la activación de una proteína G.

En bibliografía se describe que el MC4R señala principalmente a través de la proteína  $G_s$  aumentando los niveles citoplasmáticos de AMPc (Gantz *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2003; Shinyama *et al.*, 2003). Entonces, nos enfocamos directamente en la vía de señalización por  $G_s$ . Utilizamos la toxina del cólera (ChTx) que produce ADP-ribosilación en la subunidad  $G_{\alpha s}$  y lleva eventualmente a la pérdida de actividad de la proteína  $G_s$  (Chang & Bourne, 1989). En este ensayo, incubamos células HEK293t co-expresando  $\text{Ca}_v2.2$  y MC4R con ChTx 500 ng/ml por 20 hs (tiempo de expresión de las proteínas). Luego, medimos la inhibición de las  $I_{\text{Ca}}$  por MTII en concentración saturante (entre 100 y 250 nM) y no observamos una inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  (NS de cero,  $p=0,61$ ). Además, esta inhibición fue significativamente diferente a la inhibición en condición control sin la incubación con ChTx (figura 25B).

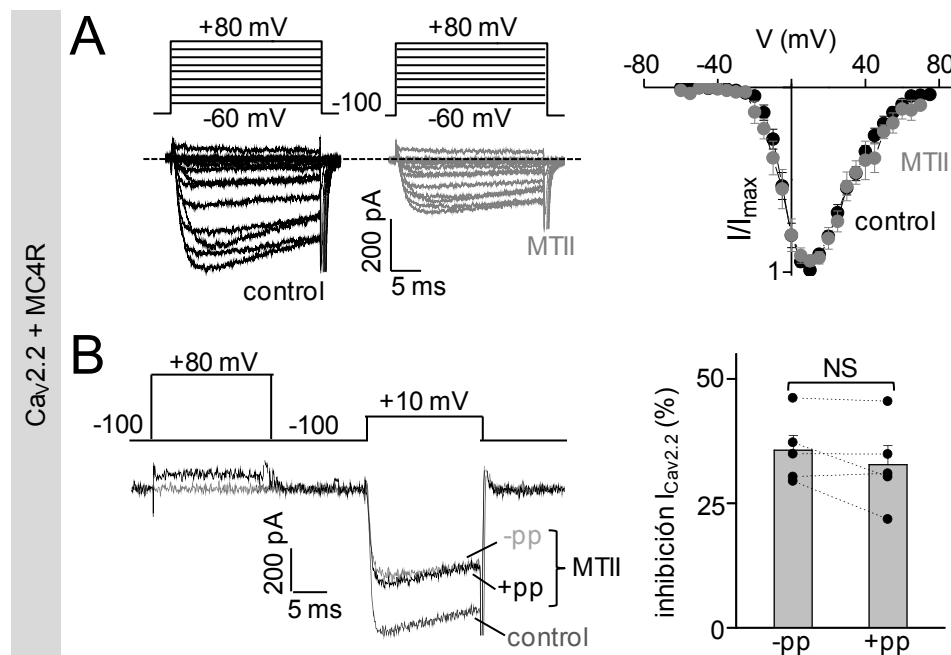


**Figura 25. El bloqueo de Gs impide la inhibición de los Cav2.2 por MTII.** **A**, trazos representativos de la  $I_{Ca}$  y valores promedio de la inhibición de la  $I_{Ca}$  producida por MTII 250 nM para células HEK293 co-expresando MC4R y Cav2.2 (- RGS2), y MC4R, Cav2.2 y RGS2 (+ RGS2) evocadas a + 10 mV desde un potencial de reposo de - 100 mV por 15 ms. **B**, trazos representativos de la  $I_{Ca}$  y valores promedio de la inhibición de la  $I_{Ca}$  producida por MTII 250 nM para células HEK293 co-expresando MC4R y Cav2.2 sin (- ChTx), y con la incubación por 20 hs con toxina del cólera 500 ng/ml (+ ChTx). Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas.

#### *- Dependencia del voltaje de la inhibición del Cav2.2 por la actividad del MC4R evocada por agonista*

El Cav2.2 es un canal muy sensible a la inhibición mediada por las vías de proteínas G. Tal como mencioné en la introducción, las inhibiciones pueden ser de dos tipos: dependientes o independientes del voltaje. Para estudiar la dependencia del voltaje de la inhibición del Cav2.2 producida por el MTII realizamos curvas IV en condiciones control y luego de la aplicación de MTII en concentración saturante (250 nM) midiendo la  $I_{Ca}$  de células HEK293t co-expresando el Cav2.2 y el MC4R en relación 1:1 molar (figura 26A). Ajustamos los datos de corriente obtenidos a cada voltaje con una ecuación de Boltzman-lineal para calcular el parámetro  $V_{1/2}$ . No observamos diferencias significativas en los valores del  $V_{1/2}$  para la condición control y luego de la aplicación de MTII (control:  $1,28 \pm 1,3$  mV; MTII:  $0,12 \pm 3,0$  mV; NS entre sí,  $p=0,56$ ;  $n=7$ ) (figura 26A). También realizamos un protocolo de voltaje en el cual se aplica antes del pulso de registro un pulso de corriente muy despolarizante (+80 mV) capaz de remover la unión entre  $G_{\beta\gamma}$  y el canal y

así eliminar la inhibición dependiente del voltaje. Medimos las  $I_{Ca}$  de células transfectadas y encontramos que en condiciones control (sin la aplicación de MTII) el pre-pulso no provoca cambios en la corriente ( $I+pp = 0,95 \pm 1,67$  % de la  $I$  control;  $n = 5$ ;  $p = 0,6$ ). Luego, comparamos la inhibición de la corriente  $Ca_v2.2$  por MTII sin pre-pulso ( $I-pp$ ) y con pre-pulso ( $I+pp$ ) y encontramos que los valores no son significativamente diferentes ( $35,6 \pm 3,0$  %;  $32,7 \pm 3,8$  %;  $p = 0,57$ ;  $n = 5$ ) (figura 26B).

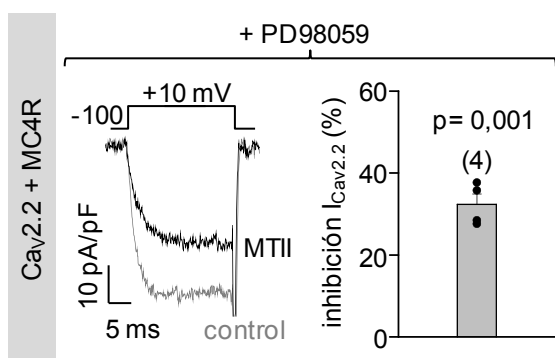


**Figura 26. La inhibición del  $Ca_v2.2$  por la activación del MC4R evocada por MTII es independiente del voltaje.** **A**, trazos representativos y curvas IV promedio normalizadas de  $I_{Ca}$  para  $Ca_v2.2$  a distintos potenciales (de -60 a +80 mV) co-expresado en células HEK293t con MC4R en condición control y luego de la aplicación de MTII 250 nM. **B**, trazos representativos de corrientes de calcio del  $Ca_v2.2$  precedidas (+ pp) o no (- pp) por un pre-pulso a + 80 pA en condición control y con la aplicación de MTII 250 nM. Y porcentajes de la inhibición de la corriente de  $Ca_v2.2$  sin pre-pulso aplicado (-pp) o con pre-pulso previo (+pp) ( $n = 5$   $I_{Ca}$  registradas).

#### - Dependencia de la fosforilación de ERK1/2 para la inhibición del $Ca_v2.2$ por la actividad del MC4R dependiente de agonista

Aquí ensayamos si la inhibición del  $Ca_v2.2$  producida por la activación del MC4R dependiente de agonista depende de la fosforilación de la proteína ERK1/2. Para esto, utilizamos un inhibidor de la proteína MEK1/2 (MAP/ERK quinasa 1/2) denominado

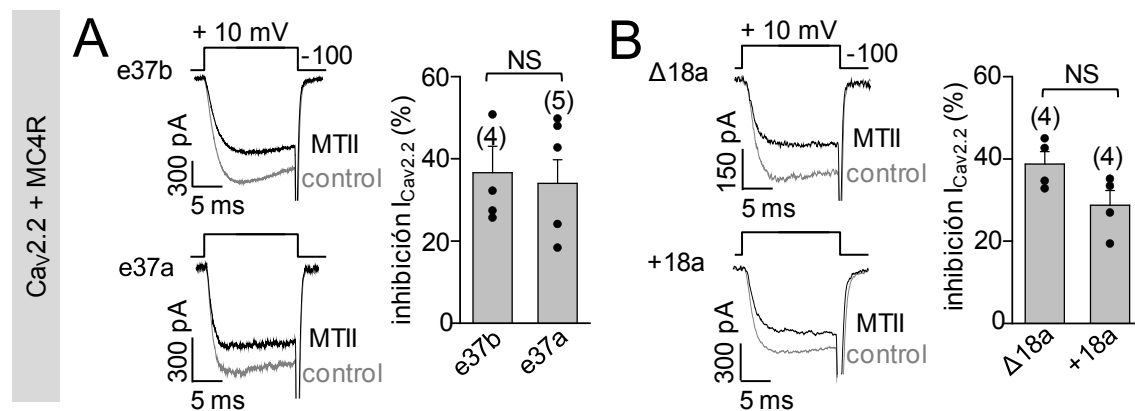
PD98054 (la MEK1/2 es la quinasa encargada de fosforilar a ERK1/2). Entonces, para realizar este estudio, incubamos células HEK293t co-expresando el  $\text{Ca}_v2.2$  y el MC4R con PD98054 20  $\mu\text{M}$ . 24 hs después de la transfección (y 20 hs de incubación con PD98054) registramos las  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  en células transfectadas. Sobre estas corrientes aplicamos MTII 250 nM. Como se muestra en la figura 27, observamos una inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  en un porcentaje similar a cuando las células no son incubadas con el inhibidor. Por lo que la fosforilación de ERK1/2 no sería necesaria para la inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  a través de la activación del MC4R evocada por agonista.



**Figura 27. La inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  por MTII no depende de la vía de fosforilación de ERK1/2.** Trazos representativos, valor promedio (barra) e individuales (puntos negros) para la inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  por MTII 250 nM en células HEK293t co-expresando  $\text{Ca}_v2.2$  y MC4R incubadas con PD98059 20  $\mu\text{M}$ . Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{\text{Ca}}$  registradas.

#### - Comparación de la inhibición del $\text{Ca}_v2.2$ por la actividad del MC4R evocada por agonista en distintas isoformas del canal.

En el sistema nervioso central se encuentran distintas isoformas del  $\text{Ca}_v2.2$  que poseen distinta sensibilidad a las vías de proteína G. Nosotros decidimos ensayar si cuatro de estas isoformas del  $\text{Ca}_v2.2$  presentan una sensibilidad diferencial a la inhibición provocada por la activación del MC4R. Para esto, transfectamos células HEK293t con el MC4R y las isoformas del  $\text{Ca}_v2.2$  que incluyen al exón 37a o al 37b, y con o sin el exón 18 ( $18^a$  o  $\Delta 18a$ , respectivamente) en proporción 1:1 molar y aplicamos MTII 250 nM de manera aguda a las  $I_{\text{Ca}}$  registradas. Como se muestra en la figura 28 no se ven diferencias significativas en la inhibición de la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$  por la activación del MC4R sobre las distintas isoformas estudiadas.



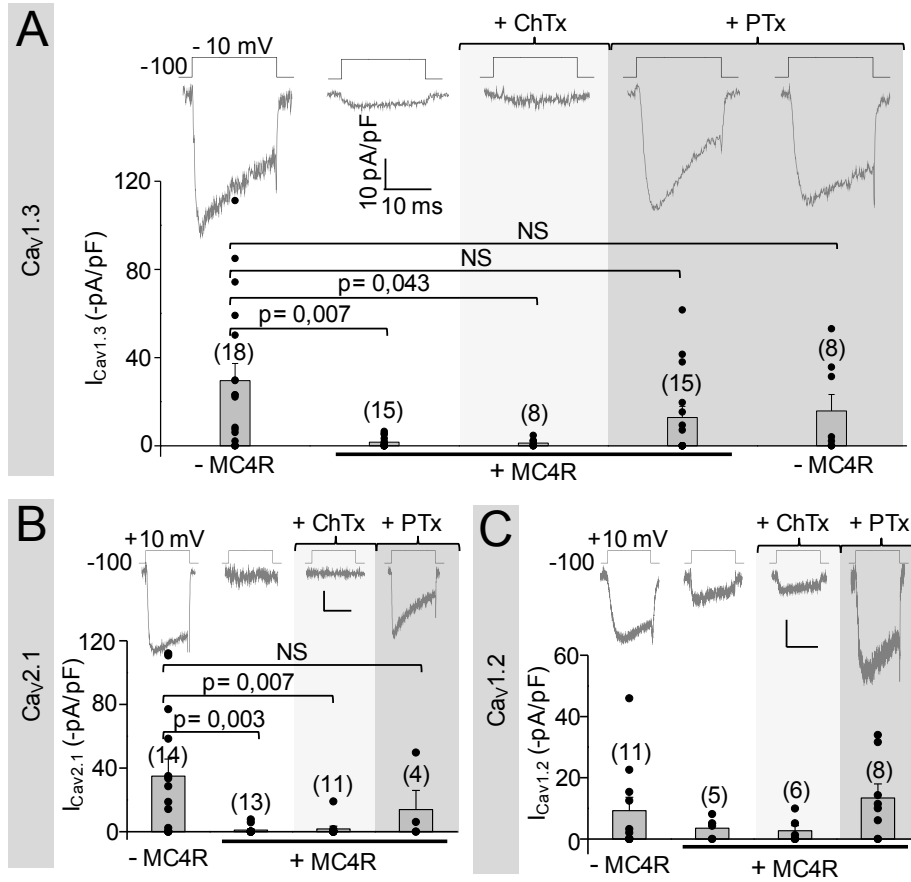
**Figura 28. La inhibición de  $Ca_v2.2$  por MTII es independiente de las distintas isoformas de  $Ca_v2.2$ .** Trazos representativos de la  $I_{Ca}$  y valores promedios de la inhibición de la  $I_{Ca}$  por la aplicación de MTII 250 nM para  $Ca_v2.2$  co-expresado en células HEK293t con MC4R para las isoformas  $Ca_v2.2e37b$  y  $Ca_v2.2e37a$  (A) y para  $Ca_v2.2e37b\Delta18a$  y  $Ca_v2.2e37b+18a$  (B). Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas.

El  $Ca_v2.2$  utilizado en los capítulos anteriores y el que se utilizará de aquí en adelante en los sucesivos experimentos es la isoforma que incluye el exón 37b y no incluye al 18a. Es denominado “ $Ca_v2.2$ ” por simplicidad.

## Cascadas intracelulares involucradas en la actividad constitutiva del MC4R que inhibe los $Ca_v$

### - Vía de proteína G involucrada en la inhibición de los $Ca_v1.2$ , $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$ por la actividad constitutiva del MC4R

Aquí decidimos estudiar si la inhibición de los  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  a través de la actividad constitutiva del MC4R depende de la proteína Gs, al igual que la actividad del MC4R dependiente de agonista que inhibe al  $Ca_v2.2$ . Para esto, incubamos células HEK293t co-expresando cada  $Ca_v$  y el MC4R con ChTx durante las 44 hs de expresión de las proteínas. Medimos la densidad de  $I_{Ca}$  de las células transfectadas y observamos que el tratamiento con ChTx no bloquea la inhibición de los  $Ca_v$  (figura 29A, B y C). Por lo tanto, las vías de señalización de los dos modos de activación del MC4R señalizan por cascadas intracelulares distintas para inhibir los distintos subtipos de  $Ca_v$ .



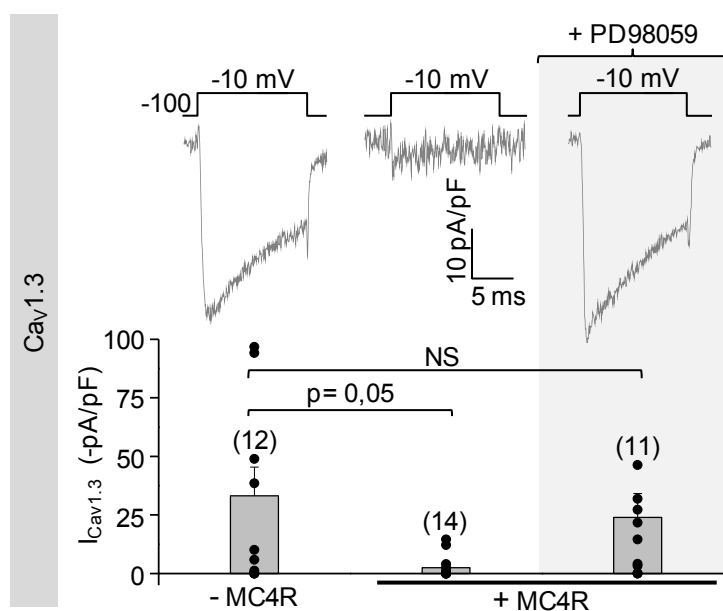
**Figura 29. El bloqueo de Gi/o impide la inhibición de los Ca<sub>v</sub> por la actividad constitutiva del MC4R.** Trazos representativos, valores promedio (barras) e individuales (puntos negros) de  $I_{Ca}$  para células HEK293t expresando Ca<sub>v</sub>1.3 (A), Ca<sub>v</sub>2.1 (B) o Ca<sub>v</sub>1.2 (C) sin (- MC4R) o con MC4R (+ MC4R). Los paneles grises claros indican incubación de las células con ChTx por 44 hs, y los paneles grises oscuros la incubación con PTx por 44 hs. Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 ó -10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Las líneas de escala corresponden a los mismos valores que en A. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas.

Luego, ensayamos otro mecanismo de señalización para la actividad constitutiva del MC4R incubando las células con la toxina pertussis (PTx) que bloquea a la proteína Gi/o (Katada *et al.*, 1984), ya que ciertos trabajos científicos describen el posible acoplamiento del MC4R a esta proteína G (Buch *et al.*, 2009). Al medir la densidad de las  $I_{Ca}$  de las células transfectadas, observamos que en los 3 subtipos de Ca<sub>v</sub>, la densidad de  $I_{Ca}$  de las células incubadas con PTx es similar a la condición control sin MC4R (figura 29A, B y C). A modo de control, realizamos un ensayo incubando con PTx células HEK293t expresando sólo Ca<sub>v</sub>1.3 sin el MC4R. Observamos que la densidad de la  $I_{Ca}$  de esta condición fue similar a la obtenida en la condición control expresando el Ca<sub>v</sub>1.3 sin MC4R y sin incubación con PTx, por lo que esta toxina no aumenta las  $I_{Ca}$  de los Ca<sub>v</sub> de manera

inespecífica (figura 29A). Por lo tanto, la actividad constitutiva del MC4R que produce la inhibición de los  $\text{Ca}_v$ , es dependiente de la proteína Gi/o e independiente de Gs.

*- Dependencia de la fosforilación de ERK1/2 para la inhibición del  $\text{Ca}_v1.3$  por la actividad constitutiva del MC4R*

Tal como ensayamos para la inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  por la actividad del MC4R evocada por agonista, decidimos estudiar también la dependencia de la actividad constitutiva del MC4R con la fosforilación de ERK1/2. Para esto, incubamos con PD98054 (inhibidor de la proteína MEK1/2) células HEK293t co-expresando el MC4R y el  $\text{Ca}_v1.3$  en proporción 1:1 molar durante las 44 hs de expresión de las proteínas. Al medir las  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v1.3$  de las células transfectadas, observamos niveles de densidad de  $I_{\text{Ca}}$  similares a la condición control (figura 30). Las células HEK293t poseen una activación basal de ERK1/2 de manera endógena, y los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  son sensibles a la inhibición por la proteína ERK1/2 fosforilada (Subramanian & Morozov, 2011). Entonces realizamos un experimento control para descartar que la acción del PD98054 se deba al bloqueo de la fosforilación de ERK1/2 basal que pueda estar inhibiendo las corrientes de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ . Incubamos células HEK293t expresando el  $\text{Ca}_v1.3$  sin MC4R con PD98054 o con vehículo. Al comparar los niveles de  $I_{\text{Ca}}$  de las dos condiciones no encontramos diferencias significativas (nivel de  $I_{\text{Ca}}$  en células sin PD98054 =  $-28.08 \pm 13.8$ ; y en células con PD98054 =  $-35.86 \pm 10.9$ ; NS entre sí;  $n = 21$  en cada condición).



**Figura 30. El bloqueo de la fosforilación de ERK1/2 impide la inhibición del  $\text{Ca}_v1.3$  por la actividad constitutiva del MC4R.** Trazos representativos, valores promedio (barras) y valores individuales (puntos negros) de la  $I_{\text{Ca}}$  de células HEK293t expresando  $\text{Ca}_v1.3$  sin (- MC4R) o con (+MC4R) MC4R. El panel gris indica previa incubación con PD98059 20  $\mu\text{M}$ . Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (-10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{\text{Ca}}$  registradas.

Por lo tanto, la actividad constitutiva del MC4R depende de la fosforilación de la proteína ERK1/2 para inhibir al menos los  $\text{Ca}_v1.3$ .

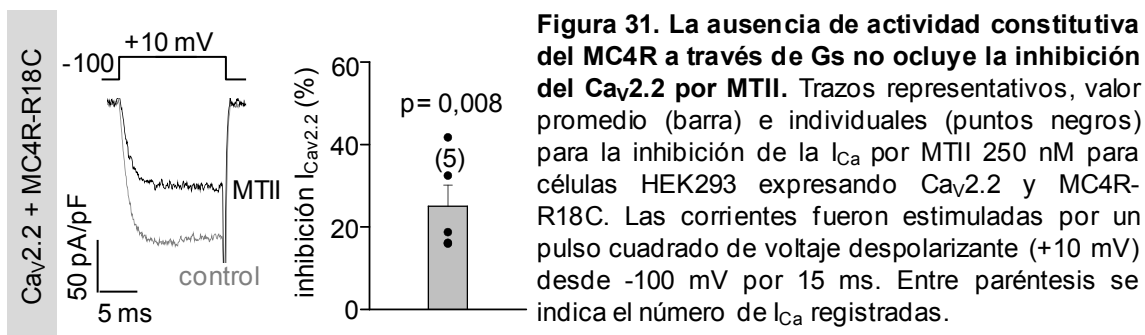
### Inter-dependencia de las vías de señalización activadas por los dos modos de activación del MC4R

Una vez estudiadas las vías de señalización utilizadas por el MC4R para inhibir cada subtipo de  $\text{Ca}_v$  dependiendo de su modo de activación, decidimos estudiar si ambas vías estaban conectadas entre sí, y si la activación de una de ellas, conlleva a la activación de la otra. Hicimos uso de distintas herramientas para este estudio. En primer lugar, utilizamos un mutante del MC4R que carece de actividad por  $G_s$  exclusivamente a través de su actividad constitutiva. Luego estudiamos la dependencia de la actividad evocada por agonista del MC4R con  $G_{i/o}$  para inhibir las corrientes del  $\text{Ca}_v2.2$ . Y por último, medimos las  $I_{Ca}$  basales del  $\text{Ca}_v2.2$  en presencia de bloqueadores de las proteínas  $G_s$  y  $G_{i/o}$ . A continuación describo los detalles de cada técnica y los resultados obtenidos.

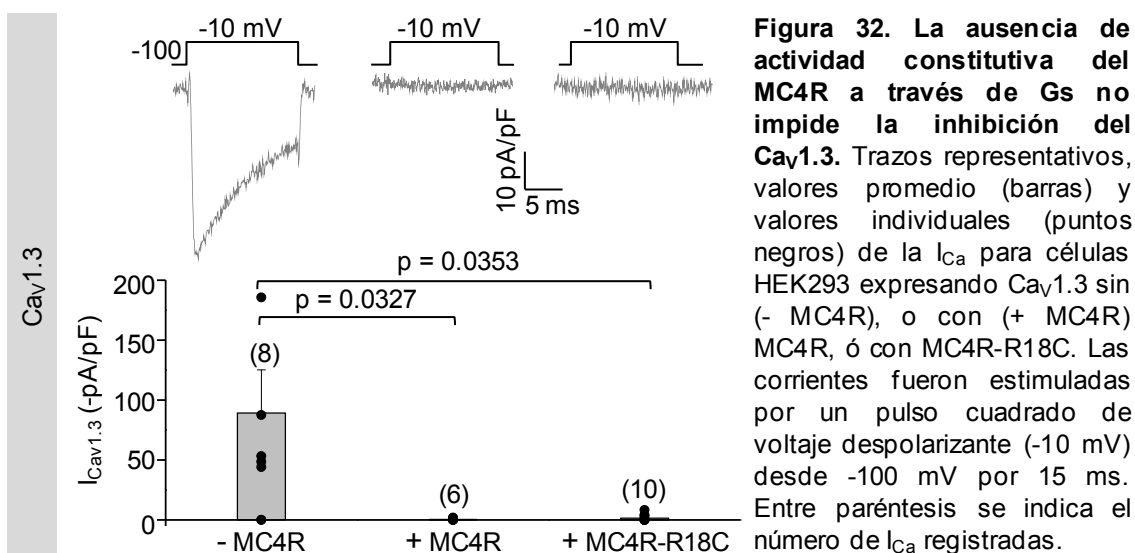
#### - Utilización de un mutante del MC4R que carece de actividad constitutiva mediada por $G_s$ .

Existe un mutante del MC4R que carece de actividad constitutiva mediada por  $G_s$ , mientras que mantiene su actividad evocada señalizando por la misma proteína  $G$  (Srinivasan *et al.*, 2004). La mutación puntual que confiere esta propiedad es la R18C (cambio de arginina por cisteína en la posición 18). Decidimos hacer uso de este mutante (MC4R-R18C) para estudiar si la actividad constitutiva del MC4R que señala a través de  $G_{i/o}$  e inhibe los  $\text{Ca}_v$ , necesita además del funcionamiento de la actividad constitutiva por  $G_s$  que fue descripta previamente en otros trabajos. Obtuvimos el MC4R-R18C a través de sub-clonados y mutaciones a partir del plásmido conteniendo el receptor salvaje (ver Materiales y Métodos), por lo que en un principio probamos su funcionalidad. Para esto, transfectamos células HEK293t con el  $\text{Ca}_v2.2$  y el MC4R-R18C en relación 1:1 molar. Luego de 24 hs de la transfección registramos las  $I_{Ca}$  de células transfectadas y aplicamos MTII 250 nM. Pudimos observar que la corriente se inhibe de manera similar al MC4R salvaje, por lo que el receptor mutante es funcional (figura 31).





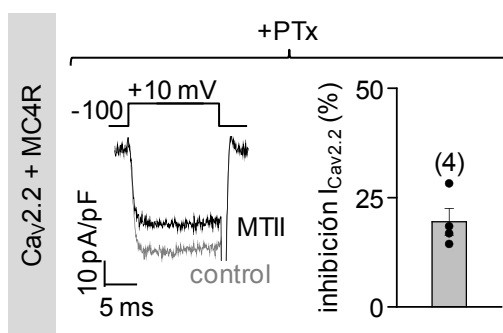
Una vez comprobada la funcionalidad del MC4R-R18C, ensayamos la dependencia de la vía por  $G_s$  y  $G_{i/o}$  en la actividad constitutiva del MC4R que inhibe las corrientes  $Ca_v$ . Para esto, co-transfectamos células HEK293t con el MC4R-R18C y el  $Ca_v1.3$  en proporción 1:1 molar. Luego de las 48 hs medimos las  $I_{Ca}$  de células transfectadas y observamos que la densidad de corriente del  $Ca_v1.3$  en esta condición no se modifica con respecto a la condición expresando el MC4R salvaje (figura 32). Por lo tanto, aunque la actividad constitutiva del MC4R que señala por  $G_s$  se encuentre ausente, la actividad constitutiva que inhibe al  $Ca_v1.3$  dependiente de  $G_{i/o}$  permanece activa.



#### - Dependencia con $G_{i/o}$ de la actividad del MC4R evocada por agonista a través de $G_s$

Como ambos modos de activación del MC4R utilizan distintas vías de señalización para inhibir los distintos subtipos de  $Ca_v$ , decidimos estudiar si al bloquear la vía por la cual señala la actividad constitutiva del MC4R de manera dependiente de  $G_{i/o}$ , se ve

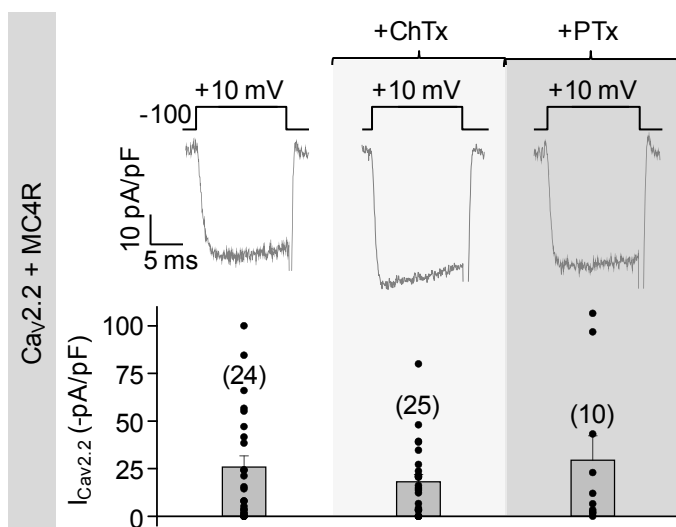
afectada también la vía de señalización por la cual la activación del MC4R por agonista, inhibe al  $\text{Ca}_v2.2$ . Para realizar este estudio, incubamos con PTx por 20 hs células HEK293t expresando el  $\text{Ca}_v2.2$  y el MC4R. Luego de las 24 hs a partir de la transfección, registramos las  $I_{\text{Ca}}$  de células transfectadas y aplicamos MTII 250 nM. Como se observa en la figura 33, MTII logra inhibir la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$ , por lo que la actividad constitutiva del MC4R que señaliza por  $G_{i/o}$  no es necesaria para la señalización de la actividad dependiente de agonista a través de  $G_s$ .



**Figura 33. El bloqueo de  $G_{i/o}$  no impide la inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  por MTII.** Trazos representativos, valor promedio (barra) e individuales (puntos negros) para el efecto de MTII 250 nM sobre la  $I_{\text{Ca}}$  al pico de células HEK293 co-expresando  $\text{Ca}_v2.2$  y MC4R incubadas con PTx durante 20 hs. Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{\text{Ca}}$  registradas.

#### - Dependencia de la $I_{\text{Ca}}$ basal del $\text{Ca}_v2.2$ con la actividad constitutiva del MC4R a través de $G_s$ y $G_{i/o}$

Aquí estudiamos si al bloquear la señalización por  $G_s$  o  $G_{i/o}$  de la actividad constitutiva del MC4R, la  $I_{\text{Ca}}$  basal del  $\text{Ca}_v2.2$  se modifica. Entonces transfectamos células HEK293t con el  $\text{Ca}_v2.2$  y el MC4R en proporción 1:1 molar y luego de 20 hs de incubación con ChTx o Ptx, medimos las  $I_{\text{Ca}}$  de células transfectadas. Encontramos que los niveles de densidad de  $I_{\text{Ca}}$  no se ven modificados en ninguna de las dos maniobras experimentales utilizadas (figura 34).



**Figura 34. El bloqueo de Gs o Gi/o no afecta la  $I_{Ca}$  del Ca<sub>v</sub>2.2 por la actividad constitutiva del MC4R.**

Trazos representativos, valores promedio (barras) y valores individuales (puntos negros) de la  $I_{Ca}$  para células HEK293 expresando Ca<sub>v</sub>2.2 y MC4R en condiciones control, o incubadas con ChTx (panel gris claro) o con PTx (panel gris oscuro). Las corrientes fueron estimuladas por un pulso cuadrado de voltaje despolarizante (+10 mV) desde -100 mV por 15 ms. Entre paréntesis se indica el número de  $I_{Ca}$  registradas.

## Discusión

En este trabajo de tesis encontramos que los dos modos de activación del MC4R regulan diferencialmente subtipos de  $Ca_v$  pre- y post-sinápticos, y que esta modulación tiene impacto sobre la actividad de neuronas de la amígdala. Indagamos además en los mecanismos intracelulares implicados en este efecto, encontrando vías de señalización diferentes para cada modo de activación del MC4R.

En primer lugar caracterizamos las  $I_{Ca}$  de los distintos subtipos de  $Ca_v$  en un sistema de expresión heteróloga, para corroborar que nuestro sistema de estudio fuera apropiado. Estudiamos los parámetros biofísicos:  $V_{1/2}$ ,  $V_{rev}$  y  $k$  de las relaciones entre las  $I_{Ca}$  y el potencial aplicado en células HEK293t transfectadas con las subunidades de cada  $Ca_v$ . Los valores obtenidos de estos parámetros (tabla 1) fueron similares a los descritos previamente en trabajos de otros autores (para  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  (Xu & Lipscombe, 2001); para  $Ca_v2.2$  (Sandoval *et al.*, 2007); y para  $Ca_v2.1$  (Berecki *et al.*, 2014)). Realizamos además registros en células no transfectadas y determinamos, en nuestras condiciones de registro, la ausencia de contaminación con otras corrientes endógenas (datos no mostrados). Por otro lado observamos que la cinética de la  $I_{Ca}$  de cada subtipo de  $Ca_v$  se corresponde con la informada en la bibliografía (ver inactivación de las corrientes más pronunciada en los  $Ca_v1$  que en los  $Ca_v2$  en la figura 6, (Xu & Lipscombe, 2001)). Por otro lado, observamos que los niveles de las  $I_{Ca}$  fueron apropiados y, si bien existió una variación en la amplitud de las  $I_{Ca}$  entre células, estas condiciones se mantuvieron en los distintos días experimentales y no nos imposibilitaron de obtener resultados significativos entre condiciones. Niveles similares de variabilidad de la amplitud de las  $I_{Ca}$  pueden observarse en otros trabajos utilizando sistemas de expresión heteróloga (Scholze *et al.*, 2001; Sandoval *et al.*, 2007). Los niveles de  $I_{Ca}$  obtenidos y la homogeneidad en los parámetros biofísicos nos permite pensar además que las subunidades auxiliares de los  $Ca_v$ ,  $Ca_v\alpha_2\delta_1$  y  $Ca_v\beta_3$ , están representadas en forma homogénea a través de los experimentos junto a la subunidad principal  $Ca_v\alpha_1$ , ya que la presencia de las mismas modifica el nivel de corriente y las propiedades de activación/inactivación en función del tiempo y del voltaje. En conjunto, los resultados obtenidos en esta serie de experimentos demuestran que, tanto nuestro modelo de estudio como el método de transfección son aptos para el registro de las  $I_{Ca}$  de los  $Ca_v$  en forma aislada y con niveles adecuados de  $I_{Ca}$ .

Además utilizamos como modelo de estudio cultivos primarios neuronales de amígdala. Caracterizamos las  $I_{Na}$  y las  $I_{Ba}$  para evaluar las propiedades de las corrientes en cultivo.

Encontramos que al registrar las  $I_{Na}$ , fueron completamente inhibidas por TTX demostrando que la corriente medida se debe sólo a la apertura de canales de sodio operados por voltaje (Hille, 2001). Luego, al registrar las  $I_{Ba}$ , pudimos bloquearlas completamente con  $Cd^{++}$  demostrando que la corriente registrada en estas condiciones se debe sólo a la apertura de los  $Ca_v$ . Además, evaluamos la presencia del MC4R en las neuronas a través de la medida del efecto de MTII sobre las  $I_{Ba}$ , encontrando una respuesta en el 88 % de las neuronas ensayadas. Si bien es indirecto, este dato nos indicaría que el MC4R se encuentra expresado en un gran porcentaje de las neuronas de amígdala en cultivo. Además, estas características mencionadas se encontraron en distintos cultivos realizados, por lo que se mantuvo la reproducibilidad de las condiciones. Entonces, los cultivos primarios neuronales de amígdala resultaron ser un modelo de estudio apropiado para evaluar el efecto de los dos modos de activación del MC4R sobre las corrientes de los  $Ca_v$  y su implicancia en la actividad neuronal.

#### *Efectos de la activación del MC4R en la pre-sinapsis:*

La liberación rápida de NT en las neuronas centrales está gobernada por dos subtipos de  $Ca_v$ :  $Ca_v2.1$  y  $Ca_v2.2$ . En esta tesis encontramos que la activación del MC4R por agonista inhibe específicamente las  $I_{Ca}$  del  $Ca_v2.2$  sin afectar a las del  $Ca_v2.1$ , tanto en células HEK293t sobre-expresando MC4R y cada  $Ca_v$ , como en neuronas de amígdala en cultivo que expresan el MC4R y los  $Ca_v$  a niveles fisiológicos (figuras 11 y 14). En contraste, la actividad constitutiva del MC4R disminuye los niveles de las  $I_{Ca}$  del  $Ca_v2.1$  sin afectar a las del  $Ca_v2.2$  en ambos sistemas experimentales (figuras 7 y 17). Esta inhibición diferencial a los  $Ca_v2$  pre-sinápticos por los dos modos de activación del MC4R podría causar una regulación diferencial de la liberación de NT en función de representación de cada subtipo de  $Ca_v2$  en la terminal pre-sináptica. La llegada de agonistas del MC4R produciría una inhibición rápida de los  $Ca_v2.2$ , generando una inhibición instantánea de la fusión de vesículas sinápticas a la membrana celular; mientras que la actividad constitutiva del MC4R mantendría basalmente inhibidos a los  $Ca_v2.1$ , regulando en forma negativa las sinapsis que estos controlen. Distintas sinapsis están reguladas en diferentes proporciones por cada uno de estos subtipos de  $Ca_v$ . Por ejemplo, si bien no es una correlación absoluta, los  $Ca_v2.1$  parecen contribuir preferencialmente a la liberación de NT excitatorios, mientras que los  $Ca_v2.2$  están más frecuentemente asociados a liberación de NT inhibitorios (Burke *et al.*, 1993; Potier *et al.*,

1993; Doroshenko *et al.*, 1997; Caddick *et al.*, 1999; Leenders *et al.*, 2002) entonces, cada modo de activación del MC4R podría impactar en distintos tipos de sinapsis.

Para indagar en el impacto de estos efectos pre-sinápticos del MC4R estudiamos su implicancia en la liberación de NT rápidos en forma indirecta midiendo corrientes post-sinápticas como así también los niveles de activación neuronal.

En primer lugar, encontramos que la activación del MC4R dependiente de agonista inhibe la amplitud de las IPSC en neuronas de amígdala en cultivo (figura 20), lo que involucraría una disminución en la liberación de GABA, mientras que observamos que no modifica el tamaño de las EPSC. Por otro lado, observamos que el MC4R no modifica ni las corrientes post-sinápticas evocadas por una solución hiperosmótica ni la frecuencia de los mIPSC (figuras 21 y 22). Estos datos nos indican que el MC4R actúa a nivel pre-sináptico modificando exclusivamente la liberación de GABA inducida por la llegada de potenciales de acción. Esto concuerda con un efecto sobre los  $Ca_v2.2$  pre-sinápticos que son el *link* entre la despolarización de la pre-sinapsis y la fusión de vesículas sinápticas. Otros autores mostraron previamente que la activación del MC4R por agonista modula las IPSC y EPSC en distintos tipos neuronales. Cowley y colaboradores mostraron que la aplicación de agonistas del MC4R activa las IPSC de interneuronas GABAérgicas del PVN parvocelular medial por efectos pre-sinápticos y no afectan las EPSC en rebanadas de cerebro de ratón (Cowley *et al.*, 1999). Años más tarde, Wan y colaboradores mostraron que el MC4R regula pre-sinápticamente (desde terminales del nervio vago) la frecuencia de las EPSC (en algunas neuronas la aumentan y en otras la disminuyen) registradas en neuronas del NTS (Wan *et al.*, 2008). En otro trabajo, Fu y van den Pol muestran que en neuronas del hipotálamo ventromedial (VMH) agonistas del MC4R aumentan las IPSC espontáneas y la frecuencia de las mIPSC mediante mecanismos pre-sinápticos y no modifican la frecuencia de las EPSC espontáneas (Fu & van den Pol, 2008). Los resultados obtenidos por distintos autores y por nosotros son muy variados, indicando una compleja regulación de la sinapsis por la activación del MC4R. El MC4R se expresa en muchos núcleos cerebrales y en distintos tipos neuronales (Mountjoy *et al.*, 1994), por lo que probablemente, el mecanismo celular para ejercer su acción sea heterogéneo. Según nuestros resultados la activación de este receptor tendría un rol inhibitorio en aquellas sinapsis donde la liberación de NT esté gobernada en mayor medida por los  $Ca_v2.2$ , pero no descartamos que en muchos tipos neuronales exista un mecanismo mixto de acción involucrando otros componentes de la pre-sinapsis.

La inhibición de la liberación de GABA por la activación aguda del MC4R que describimos en esta tesis podría contribuir indirectamente a la activación neuronal demostrada por otros autores para este receptor. Esta activación consiste en aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular a partir de reservorios intracelulares (Mountjoy *et al.*, 2001), despolarización (Liu *et al.*, 2003) y activación de la expresión génica (Thiele *et al.*, 1998; Benoit *et al.*, 2000; McMinn *et al.*, 2000). Así, nosotros planteamos la siguiente hipótesis: la inhibición de los  $\text{Ca}_v2.2$  por la activación del MC4R evocada por agonista y la consecuente inhibición de la liberación de GABA en terminales pre-sinápticas desinhiben (activan) a las neuronas post-sinápticas. Ensayamos esta hipótesis realizando inyecciones icv de un agonista específico del MC4R, el RO27-3225, o del bloqueador de los  $\text{Ca}_v2.2$ , la conoTx, y midiendo la inmunoreactividad para el marcador de activación neuronal c-fos en rebanadas de cerebro de ratón. En primer lugar, observamos que el RO27-3225 causa un aumento marcado de la activación de las neuronas de todas las zonas de la amígdala con respecto a animales inyectados con vehículo (figura 23). Este efecto había sido previamente observado en otros trabajos (Thiele *et al.*, 1998; Benoit *et al.*, 2000; McMinn *et al.*, 2000). Por su parte, la conoTx también produce un aumento de la activación neuronal pero en forma heterogénea: observamos una mayor activación de neuronas de la CeA, en comparación a la BLA (figura 23). La diferencia entre los patrones de activación neuronal entre estos dos experimentos apoya nuestra hipótesis, si bien en forma indirecta, ya que estudios previos demuestran que la CeA es el sub-núcleo que recibe la mayoría de las innervaciones GABAérgicas que llegan a la amígdala: la CeA comprende una alta proporción de interneuronas GABAérgicas (Roberto *et al.*, 2003), existen proyecciones GABAérgicas desde la BLA hacia la CeA (Jovanovic & Ressler, 2010) y, además, se describió un fuerte tono GABAérgico de interneuronas en la estructura comprendida por el intercalado haciendo sinapsis en neuronas glutamatérgicas que van desde la BLA hacia la CeA (Pare *et al.*, 2004). Entonces, la conoTx estaría actuando en la pre-sinapsis de neuronas GABAérgicas que hacen sinapsis dentro de la CeA, bloqueando los  $\text{Ca}_v2.2$ , disminuyendo la liberación de GABA y produciendo consecuentemente una desinhibición (o activación) neuronal exclusivamente en neuronas de la CeA. Por otro lado, el efecto de la inyección de RO27-3225 produce una activación neuronal global en todos estos sub-núcleos. Si bien se espera que el agonista del MC4R tenga un efecto similar al de conoTx sobre los  $\text{Ca}_v2.2$ , como el MC4R está presente en la zona post-sináptica de neuronas de los distintos núcleos de la amígdala podría activar



otros mecanismos excitatorios directos allí que serían independientes de la inhibición de los  $\text{Ca}_v$ .

La inhibición de los  $\text{Ca}_v2.2$  por la actividad del MC4R en terminales GABAérgicas también podría ser relevante en el hipotálamo, donde el MC4R cumple un rol importante regulando la homeostasis del organismo, incluyendo la ingesta de alimento (Cone, 2005). Nosotros encontramos que tanto la inyección icv de RO27-3225 como de conoTx, activan las neuronas del PVN hipotalámico pero no las del ARC (datos no mostrados). Previamente se demostró la existencia del MC4R pre-sináptico en neuronas que llegan al PVN (Cowley *et al.*, 1999), y además se sabe que este núcleo recibe un fuerte tono GABAérgico (Cullinan *et al.*, 2008; Mikkelsen *et al.*, 2008). Probablemente estas neuronas GABAérgicas contengan MC4R pre-sináptico y sean gobernadas por el  $\text{Ca}_v2.2$ , y frente a la llegada de agonistas del MC4R o al bloqueo directo por conoTx, se produzca la disminución de la liberación de GABA, y así la desinhibición de las neuronas del PVN.

Como mencionamos antes la liberación de NT en la pre-sinapsis puede estar controlada por la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los  $\text{Ca}_v2.1$  y  $\text{Ca}_v2.2$ . Nosotros encontramos que en nuestras condiciones de trabajo las neuronas de la amígdala tienen ambas componentes en la  $I_{\text{Ba}}$  total (figuras 15 y 16) y además observamos una disminución del tamaño de las IPSC en presencia de bloqueantes de ambos subtipos de  $\text{Ca}_v$  pre-sinápticos (figura 19). Dado que, a diferencia de  $\text{Ca}_v2.2$ , el  $\text{Ca}_v2.1$  es sensible a la inhibición por la activación constitutiva del MC4R nosotros postulamos que las terminales sinápticas de neuronas de la amígdala que expresan el MC4R tendrán diferentes características dependiendo de la presencia o no del agonista inverso, AgRP, y de la cantidad de MC4R expresado. En ausencia de AgRP (o baja expresión del MC4R) la  $I_{\text{Ca}}$  pre-sináptica tendría menor contribución del  $\text{Ca}_v2.1$  y estaría gobernada por el  $\text{Ca}_v2.2$ . Nosotros encontramos que en ausencia de AgRP la contribución del  $\text{Ca}_v2.1$  a la  $I_{\text{Ba}}$  total es mucho menor que la de,  $\text{Ca}_v2.2$ ; y la inhibición de las IPSC por un bloqueador del  $\text{Ca}_v2.1$  es también mucho menor que la provocada por el bloqueador del  $\text{Ca}_v2.2$  (figura 19). Por otro lado, observamos una tendencia mostrando el aumento de la contribución del  $\text{Ca}_v2.1$  a la  $I_{\text{Ba}}$  total en neuronas pre-incubadas con AgRP (figura 17). En base a estos datos nosotros postulamos que la actividad constitutiva del MC4R inhibe los  $\text{Ca}_v2.1$  y disminuye su contribución a las IPSC. En un experimento futuro exploraremos el efecto de la pre-incubación con AgRP sobre la componente del  $\text{Ca}_v2.1$  a la  $I_{\text{Ba}}$  observando el efecto de agaTx sobre las IPSC.

En relación a lo anterior, en la figura 18, presentamos datos preliminares donde encontramos que la inmuno-reactividad para el  $\text{Ca}_v2.1$  estaría aumentada en neuronas de amígdala en cultivo cuando la actividad del MC4R se encuentra bloqueada por AgRP. La distribución del  $\text{Ca}_v2.1$  resultó ser en forma de *puncta* (puntos en latín) (Raingo *et al.*, 2012), generalmente relacionada con la localización pre-sináptica de la proteína en estudio. Este resultado nos indicaría que la inhibición de la  $I_{Ca}$  del  $\text{Ca}_v2.1$  por la actividad constitutiva del MC4R reduce la disponibilidad del  $\text{Ca}_v2.1$  en las sinapsis de las neuronas de la amígdala. Será importante repetir estos experimentos para confirmar el hallazgo y para corroborar mediante el uso de anticuerpos contra alguna proteína pre-sináptica (como por ejemplo sinaptobrevina 2) la disminución de la expresión del  $\text{Ca}_v2.1$  en terminales sinápticas.

Dado que los  $\text{Ca}_v2.2$  tienen una contribución mayor a la  $I_{Ba}$  en neuronas de la amígdala y son más sensibles en general a la activación de GPCRs por agonista que los  $\text{Ca}_v2.1$ ,  $\alpha$ -MSH y también agonistas de otros GPCRs (que inhiban a los  $\text{Ca}_v2.2$ ) podrán actuar modulando negativamente la liberación de NT en neuronas de la amígdala. Sin embargo, en el caso de que AgRP esté presente por tiempos prolongados en el ambiente de la neurona (o que disminuya la expresión del MC4R), la liberación de NT tendrá una mayor contribución de las  $I_{Ca}$  del  $\text{Ca}_v2.1$  y así, estas terminales serán menos sensibles a los cambios en las concentraciones de agonistas de GPCRs en el medio extracelular. Para apoyar esta hipótesis proponemos el siguiente experimento futuro: estudiar si la incubación de las neuronas con AgRP genera cambios en el % de inhibición de las IPSC por la aplicación de MTII. Esperamos que la aplicación de MTII en estas condiciones inhiba en menor proporción la amplitud de las IPSC, debido a que la activación del MC4R evocada por agonista solo inhibe las  $I_{Ca}$  de los  $\text{Ca}_v2.2$  y ahora estarán contribuyendo en un menor % a la generación de las IPSC. De esta forma demostraríamos un control diferencial de una sinapsis específica controlada por la actividad constitutiva del MC4R.

#### *Efectos de la activación del MC4R en la post-sinapsis:*

En esta tesis contribuimos a entender cómo la actividad del MC4R impacta sobre la regulación de la actividad de dos  $\text{Ca}_v$  post-sinápticos. Nuestro hallazgo más relevante y novedoso es que actividad constitutiva del MC4R inhibe en forma crónica las  $I_{Ca}$  de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ . Para probar esto utilizamos un sistema de expresión heteróloga donde

podimos examinar este efecto sobre cada subtipo de  $Ca_v$  en forma aislada observando que la incubación con el AgRP logra ocluir la inhibición de los  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ . Luego, logramos reproducir estos resultados en neuronas de amígdala en cultivo. La incubación de las neuronas con AgRP muestra una tendencia a aumentar la contribución de la  $I_{Ba}$  sensible a nifedipina (antagonista específico de los  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$ ) a la  $I_{Ba}$  total, lo que nos indica que aun cuando tanto el MC4R como los  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  están expresados bajo el control de sus promotores nativos, los  $Ca_v1$  se encuentran inhibidos parcialmente por la actividad constitutiva del MC4R. Cabe destacar que este es un experimento preliminar debido a que fue realizado en un único cultivo y debemos aumentar el número de registros de corrientes. Por otro lado, si comparamos la sumatoria de los % de inhibición de las  $I_{Ba}$  producidos por agaTx y nifedipina en condición control y en la condición incubada con AgRP obtenemos una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (figura 17). Esto puede deberse a que en algunas de las  $I_{Ba}$  de neuronas incubadas con AgRP observamos que cuando una de estas drogas inhibe un bajo % de la  $I_{Ba}$ , la otra inhibe una alta proporción (figura 17B), por lo que la sumatoria del % de ambas inhibiciones se mantiene constante en todas las corrientes estudiadas. En principio, estos datos nos indicarían que la inhibición de la actividad constitutiva del MC4R aumenta la proporción de corrientes  $Ca_v1$  y  $Ca_v2.1$  a la corriente  $Ca_v$  de neuronas de amígdala y nos sugieren algún tipo de compensación entre los niveles de desinhibición de  $Ca_v1$  y  $Ca_v2.1$ . Serán necesarios más experimentos para poder concluir al respecto.

Existe un trabajo en la bibliografía que denota la importancia que tendría el efecto que nosotros describimos aquí de la inhibición de los  $Ca_v1$  por de la actividad del MC4R. Este estudio muestra que la sobre-expresión ubicua de la proteína agouti produce obesidad en ratones. La proteína agouti es un homólogo del AgRP, y también funciona como agonista inverso del MC4R (Chai *et al.*, 2003). Cuando estos ratones transgénicos son tratados crónicamente con nifedipina se revierte, en parte, la obesidad generada por la expresión de agouti (Kim *et al.*, 1996). Este resultado indicaría un posible efecto orexigénico ocasionado por la inhibición de los  $Ca_v1.2/Ca_v1.3$  mediada por la actividad constitutiva del MC4R.

Dado el rol fundamental de los  $Ca_v1$  en el control de la expresión génica, en muchos núcleos neuronales incluida la amígdala (Hell *et al.*, 1993; Westenbroek *et al.*, 1998; Dolmetsch *et al.*, 2001; Ou & Gean, 2007; Wheeler *et al.*, 2008; Brittain *et al.*, 2012) decidimos explorar si la desinhibición de  $Ca_v1$  por la acción del agonista inverso de

MC4R es suficiente para producir un aumento mayor de la expresión del factor de transcripción c-fos cuando se estimulan los  $Ca_v1$ . Según nuestros resultados, las neuronas que expresan MC4R tendrían menor disponibilidad de  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  y en ellas sería necesario un estímulo mayor para activar la expresión de c-fos que en neuronas que no expresen el MC4R o que su actividad constitutiva esté bloqueada por AgRP. Así, la presencia prolongada de AgRP en el entorno de estas neuronas o la disminución de la expresión del MC4R permitiría que las corrientes  $Ca_v1$  estén disponibles para mediar la activación de la expresión de c-fos frente a un estímulo. Nuestros datos preliminares presentados en la figura 24 muestran que al activar los  $Ca_v1.2/Ca_v1.3$  con el agonista BayK, la cantidad de neuronas que expresan c-fos es mayor en cultivos previamente tratados con AgRP con respecto a la condición control sin incubación con AgRP. Este dato sugiere que la inhibición de la actividad constitutiva del MC4R permitiría una mayor densidad de  $Ca_v1$  en la membrana plasmática disponibles para inducir la expresión génica. Más experimentos serán necesarios para corroborar estos resultados y para determinar si la inhibición de los  $Ca_v1$  también involucra una disminución de la densidad de canales en la membrana como encontramos para el  $Ca_v2.1$ . Debido al curso temporal de los efectos observados, nosotros esperamos que el efecto de AgRP sobre estos canales post-sinápticos y sobre la expresión de c-fos sea no inmediato y planteamos que podría estar relacionado con procesos que produzcan re-arreglos de la arquitectura de las neuronas como la plasticidad a largo plazo que, se sabe, es modulada por  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  (Westenbroek *et al.*, 1990).

Si bien, como mencionamos antes, la activación aguda del MC4R no modificó la frecuencia de los mIPSC de neuronas de amígdala en cultivo, observamos un aumento leve pero significativo de la amplitud de los mismos. El cambio en la amplitud de los mIPSC depende de eventos post-sinápticos porque es necesario un aumento en la sensibilidad o el número de receptores post-sinápticos para aumentar la amplitud de la señal frente a un mismo estímulo recibido (Nguyen *et al.*, 1994). Entonces en este caso, el MC4R ejerce un efecto post-sináptico activador de las IPSC en neuronas de la amígdala que no contribuiría a la inhibición de los IPSC por mecanismos pre-sinápticos dependientes de la inhibición de los  $Ca_v2.2$ . Trabajos previos han mostrado evidencias de efectos post-sinápticos del MC4R. Se vio que MTII despolariza neuronas del PVN (Liu *et al.*, 2003) y que  $\alpha$ -MSH aumenta la frecuencia de disparo dependiente de la despolarización de la membrana celular también en el PVN (Ghamari-Langroudi *et al.*, 2010). En ambos trabajos el efecto post-sináptico observado es activador y contribuirían a

la activación neuronal típica descrita para este receptor, mientras que nuestros resultados indican un efecto post-sináptico inhibitor, aunque restaría medir el efecto sobre las mEPSC en nuestras condiciones. En conjunto estos datos sugieren que el efecto del MC4R en la sinapsis es complejo y la extensión del efecto global dependería del balance entre numerosos mecanismos.

Si bien nosotros encontramos una inhibición de los dos  $\text{Ca}_v1$  estudiados por la actividad constitutiva del MC4R, notamos que el  $\text{Ca}_v1.3$  es más sensible al efecto que el  $\text{Ca}_v1.2$ . Si se observan los resultados mostrados en la figura 9, la densidad de  $I_{\text{Ca}}$  de  $\text{Ca}_v1.3$  disminuye casi el 100 % con la co-expresión del MC4R (de  $-19,02 \pm 5,25$  a  $-0,35 \pm 0,30$  pA/pF), mientras que la densidad de la  $I_{\text{Ca}}$  para  $\text{Ca}_v1.2$  disminuye sólo en un 80 % (de  $-12,44 \pm 5,6$  a  $-2,30 \pm 0,95$  pA/pF). Valores similares vuelven a repetirse en las figuras 10 y 28 donde se analiza el efecto de la cantidad del MC4R transfectado y de la vía de proteína G involucrada en el mecanismo de acción del MC4R, respectivamente. Esta diferencia de sensibilidad entre  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  podría generar una especificidad aún más alta en la modulación de los  $\text{Ca}_v$  por el MC4R. Estudios recientes demuestran que los  $\text{Ca}_v1.3$  poseen características diferenciales con respecto a los demás  $\text{Ca}_v$  clasificados como activados por voltaje alto. Nosotros encontramos que el  $\text{Ca}_v1.3$  tiene un voltaje de activación menor a los demás  $\text{Ca}_v$  estudiados (figura 8 y tabla 1). Este dato coincide con el hallazgo de Xu & Lipscombe (2001), quienes describieron que en condiciones de concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  similares a las fisiológicas,  $\text{Ca}_v1.3$  se activa a un potencial mucho más hiperpolarizado que el resto de los  $\text{Ca}_v$  pertenecientes al grupo de  $\text{Ca}_v$  activados por voltaje alto (alrededor de 20 mV mas hiperpolarizados) (Xu & Lipscombe, 2001). Durante muchos años, las corrientes tipo L neuronales, mediadas por  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ , fueron agrupadas como todas aquellas  $I_{\text{Ca}}$  sensibles a dihidropiridinas pero en el presente, al conocer esta propiedad distintiva de los  $\text{Ca}_v1.3$ , podrían encontrarse funciones específicas de este  $\text{Ca}_v$  antes desconocidas ya que podrían activarse en respuesta a estímulos fisiológicos que no abren a los  $\text{Ca}_v1.2$  (Lipscombe *et al.*, 2004). Además, si bien  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  se encuentran localizados en somas y dendritas neuronales, la sub-localización de cada subtipo parece ser distinta (Hell *et al.*, 1993; Westenbroek *et al.*, 1998), como así también la co-localización con proteínas claves para la función neuronal. Por ejemplo, se encontró que los  $\text{Ca}_v1.3$  co-localizan con canales de  $\text{K}^+$  activados por  $\text{Ca}^{+2}$  (SK) y de esta manera logran controlar su actividad en forma precisa a nivel de nanodominio. Los SK controlan la hiperpolarización lenta del período refractario del potencial de acción luego de un tren de potenciales de acción en neuronas del área CA1

del hipocampo (Bowden *et al.*, 2001). De esta manera, la actividad constitutiva del MC4R podría inhibir la disponibilidad de los  $\text{Ca}_v1.3$  en el soma neuronal manteniendo inhibida la hiperpolarización de la membrana plasmática a través de los SK y contribuyendo así a la activación neuronal descrita como efecto general para el MC4R. Por su lado, los  $\text{Ca}_v1.2$  permanecerían más disponibles en la membrana plasmática y frente a un estímulo podrían activar la expresión de genes específicos (Gomez-Ospina *et al.*, 2006), debido a su menor sensibilidad a la actividad constitutiva del MC4R.

### *Mecanismo de modulación de los dos modos de activación del MC4R sobre los $\text{Ca}_v$*

Nosotros encontramos que los dos modos de activación del MC4R inhiben de manera diferencial a distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$ : la activación por agonista del MC4R inhibe los  $\text{Ca}_v2.2$ , mientras que la actividad constitutiva inhibe los  $\text{Ca}_v2.1$ ,  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$ . Nosotros postulamos que el mecanismo de inhibición en ambos casos debería tener como blanco a la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  ya que en todos los casos utilizamos las mismas subunidades auxiliares y si el blanco de acción fuera una de ellas, deberíamos observar la misma modulación en los distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$ . Sin embargo no podemos descartar que la diferente interacción entre las subunidades juegue un rol importante. Para descartar esta posibilidad deberíamos realizar más ensayos y determinar el requerimiento de las subunidades auxiliares en el efecto del MC4R sobre los distintos subtipos de  $\text{Ca}_v$ . Esto es especialmente importante para el efecto de la actividad constitutiva del MC4R, ya que en nuestro laboratorio encontramos que la actividad constitutiva del receptor de ghrelin (GHSR1a) inhibe las corrientes de todos los  $\text{Ca}_v$  activados por voltaje alto ensayados ( $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$ ,  $\text{Ca}_v2.1$  y  $\text{Ca}_v2.2$ ) de manera dependiente de la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  sin modular la corriente del  $\text{Ca}_v3.2$  (datos aun no publicados). En el caso del MC4R, como nosotros no observamos efecto de la actividad constitutiva sobre el  $\text{Ca}_v2.2$  aun en presencia de la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$ , planteamos que el mecanismo es diferente, ya sea porque no depende de  $\text{Ca}_v\beta$  o porque en el caso de  $\text{Ca}_v2.2$  existe algún otro efecto que enmascara la inhibición. Para obtener una perspectiva más general del control del MC4R sobre los  $\text{Ca}_v$  neuronales podríamos también estudiar el efecto de la activación del MC4R sobre las  $I_{\text{Ca}}$  de los subtipos de  $\text{Ca}_v$  no estudiados en esta tesis. Si bien nosotros no lo confirmamos, los  $\text{Ca}_v2.3$  y/o  $\text{Ca}_v3$  podrían ser insensibles a la modulación de la actividad constitutiva del MC4R, debido a que al bloquear esta actividad con AgRP en neuronas parece disminuir la proporción de  $I_{\text{Ba}}$  no sensible a conoTx, agaTx y nifedipina con

respecto a neuronas sin incubar con AgRP (figura 17). Probablemente, la proporción de  $I_{Ba}$  no sensible a las drogas mencionadas sea corriente  $Ca_v2.3$ , debido a que al potencial de registro (0 mV) la corriente de los  $Ca_v3$  sería pequeña y además se describió que la amígdala expresa elevadas cantidades de  $Ca_v2.3$  (Lee *et al.*, 2002). Para estudiar esta hipótesis deberíamos realizar más experimentos bloqueando específicamente las corrientes de  $Ca_v2.3$  (o de los distintos subtipos de  $Ca_v3$ ) en neuronas y además podríamos expresar cada  $Ca_v$  en células HEK293t junto al MC4R para estudiar el comportamiento de las  $I_{Ca}$  frente a los dos modos de activación del MC4R, tal como lo hicimos con los  $Ca_v$  estudiados en este trabajo de tesis.

En cuanto al mecanismo de la actividad constitutiva del MC4R nosotros encontramos que el AgRP sólo restituye las  $I_{Ca}$  de los  $Ca_v$  cuando es aplicado durante un largo plazo, por lo que el mecanismo involucrado en la inhibición no es de reversión rápida. Esto conduce a pensar que la reversión del efecto implica la síntesis *de novo* de los  $Ca_v$ . Como la inhibición de la expresión génica queda descartada debido a que la inhibición de los  $Ca_v$  la observamos tanto en neuronas que expresan los  $Ca_v$  bajo el control de promotores nativos, como así también en el sistema de expresión heteróloga donde la regulación de la expresión génica depende de promotores constitutivos, proponemos que el mecanismo de inhibición de los  $Ca_v$  involucra una vía de modulación post-transduccional. Entonces, el mecanismo inhibitorio podría implicar la translocación de los  $Ca_v$  internalizándolos desde la membrana plasmática hacia compartimentos intracelulares o podría implicar una disminución del tráfico de los  $Ca_v$  desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática, con la posibilidad en ambos casos de una posterior degradación. Para estudiar estos posibles mecanismos, deberíamos realizar experimentos en los cuales podamos marcar a los  $Ca_v$  y estudiar su sub-localización en membrana plasmática y en distintos compartimentos intracelulares membranosos en presencia o ausencia de la actividad constitutiva del MC4R y comparar si existen diferencias en la sub-localización entre ambas condiciones. El estudio preliminar que realizamos en neuronas de amígdala donde observamos una disminución de la inmunoreactividad del  $Ca_v2.1$  nos estaría dando un indicio de que este  $Ca_v$  disminuye su densidad en cultivos neuronales de amígdala por la actividad constitutiva del MC4R. En relación a esto, en el laboratorio encontramos recientemente que la actividad constitutiva de otro GPCR, el GHSR1a, inhibe los  $Ca_v$  pre-sinápticos disminuyendo la densidad de los mismos en la membrana plasmática (Lopez Soto *et al.*, 2015). En ese trabajo mostramos que en células HEK293t sobre-expresando los  $Ca_v$  pre-sinápticos y el GHSR1a disminuye la cantidad de  $Ca_v$  en la membrana



plasmática comparado con la condición expresando un mutante del GHSR1a sin actividad constitutiva. Un mecanismo similar podría estar implicado en la acción del MC4R. En cuanto a cómo pueden ocurrir estos mecanismos, trabajos recientes indican que distintos subtipos de  $Ca_v$  pueden ser fosforilados para luego ser ubiquitinilados y degradados por el proteosoma (Altier *et al.*, 2011; Gandini *et al.*, 2014a; Gandini *et al.*, 2014b). Este tipo de mecanismos de inhibición que involucra modulación del tráfico de los  $Ca_v$  es de interés actual, ya que se aleja de los mecanismos clásicos de inhibición de los  $Ca_v$  mencionados en la introducción de este trabajo.

Por otro lado, encontramos que la inhibición basal de los  $Ca_v$  por la actividad constitutiva del MC4R es proporcional a la cantidad de MC4R expresado en células HEK293t (figura 8). Estos resultados se relacionan con estudios previos realizados *in vivo* que demuestran que el nivel de expresión del MC4R se modifica con condiciones fisiológicas extremas. Se propone que la actividad del MC4R (constitutiva y evocada por agonista) inhibe tónicamente la ingesta de alimento (Kask & Schioth, 2000). En un estudio independiente, Enriori y colaboradores observaron que animales obesos (alimentados con una dieta alta en grasa) aumentan significativamente la expresión del MC4R en el PVN (Enriori *et al.*, 2007). El aumento de la cantidad de MC4R en las neuronas podría estar actuando como un mecanismo de defensa frente al aumento de peso del animal: el aumento de la cantidad de MC4R aumenta los mecanismos desencadenados por la actividad constitutiva y por lo tanto se inhibe la ingesta de alimento. A su vez, Huszar y colaboradores encontraron que ratones heterocigotas para el gen codificante del MC4R presentan un peso corporal intermedio entre ratones salvajes y ratones homocigotas que no contienen el gen para el MC4R (Huszar *et al.*, 1997). Este caso de hemicigosis en el fenotipo observado refuerza aún más la idea de que el control del peso corporal está estrechamente relacionado con la cantidad de MC4R expresado debido a que pocos ratones que expresan un gen en un único alelo presentan un fenotipo intermedio.

En general, en bibliografía se describe al MC4R como un GPCR acoplado a la proteína  $G_s$ , tanto por su actividad dependiente de agonista, como por la constitutiva, (Gantz *et al.*, 1993; Gao *et al.*, 2003; Shinyama *et al.*, 2003). En estos trabajos evalúan el grado de actividad del MC4R (dependiente de agonista y constitutiva) midiendo la acumulación del AMP cíclico citoplasmático, es decir, midiendo un segundo mensajero que tradicionalmente es aumentado por la vía de  $G_s$ . Nosotros, en lugar de medir segundos mensajeros, utilizamos directamente las toxinas ChTx y PTx que inhiben la activación de



la vía de señalización a través de  $G_s$  y  $G_{i/o}$ , respectivamente (Katada *et al.*, 1984; Chang & Bourne, 1989). Mediante esos estudios, encontramos que la actividad evocada por agonista del MC4R señala por una vía dependiente de  $G_s$  para inhibir al  $Ca_v2.2$ , pero utiliza una vía dependiente de  $G_{i/o}$  para inhibir las  $I_{Ca}$  de  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  a través de su actividad constitutiva. Este hallazgo es razonable, ya que si ambas vías de activación del MC4R señalizaran a través de  $G_s$ , lo más probable sería que la actividad evocada por agonista se integre con la vía de señalización de la actividad constitutiva y entonces no se podría explicar cómo cada modo de activación puede inhibir diferencialmente a distintos subtipos de  $Ca_v$ . Previamente otros autores encontraron también algunas evidencias del acoplamiento del MC4R a la proteína  $G_{i/o}$ . Buch y colaboradores muestran cómo el MC4R salvaje puede acoplarse a  $G_s$  y  $G_{i/o}$ , y la mutación puntual D90N (cambio de aspartato por asparagina en la posición 90) modifica el receptor permitiendo su acoplamiento solo a  $G_{i/o}$  y bloqueando la interacción con  $G_s$  (Buch *et al.*, 2009). Por lo tanto, tan solo el intercambio de un aminoácido en la proteína originaría un cambio en la estructura del receptor que cambia el acoplamiento del MC4R con distintas proteínas G. Otro mutante del MC4R, el MC4R-R18C que utilizamos en este trabajo, no se acopla a  $G_s$  en forma constitutiva pero puede interaccionar con  $G_s$  cuando se activa por agonista (Srinivasan *et al.*, 2004). Además, otro trabajo muestra que el MC4R también puede acoplarse a  $G_q$  cuando se activa por agonista (Newman *et al.*, 2006). Entonces, el MC4R es un GPCR muy promiscuo en su acople a proteínas G que, dependiendo del modo de activación, el ligando, o el sistema de estudio utilizado, puede interaccionar con distintas proteínas G. Es posible que el MC4R posea distintos estados conformacionales activados que permiten su interacción con distintas proteínas G (Breit *et al.*, 2011). Además, si observamos la figura 29, puede observarse que si bien para el  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  la condición incubada con PTx no es significativamente distinta a la condición control ( $Ca_v$  sin MC4R y sin incubación con PTx), el nivel de densidad de  $I_{Ca}$  parece no recuperarse completamente. Entonces, es posible que esta inhibición por la actividad constitutiva del MC4R, además de la vía dependiente de  $G_{i/o}$ , involucre otra cascada de señalización que también inhiba los  $Ca_v$ . Cada vez son más los GPCR que se encuentra que no exclusivos de una única vía de señalización por proteína G, sino que existe un equilibrio en la célula de varias vías de segundos mensajeros activadas por distintas proteínas G (M'Kadmi *et al.*, 2015). Más estudios serán necesarios para determinar si la actividad constitutiva del MC4R activa otras vías de señalización para inhibir las corrientes de los  $Ca_v$  en forma constitutiva.

En cuanto a las vías activadas aguas debajo de la activación de las proteínas G encontramos que la actividad constitutiva del MC4R induce la fosforilación de la proteína ERK1/2 para inhibir las  $I_{Ca}$  de al menos los  $Ca_v1.3$ . Por su parte, la inhibición de las  $I_{Ca}$  del  $Ca_v2.2$  por la actividad del MC4R evocada por agonista es independiente de esta fosforilación (figura 27). La fosforilación de ERK1/2 es desencadenada por muchas vías de señalización intracelular y no es exclusiva de un subtipo de proteína G. Los 4 subtipos de proteínas  $G_\alpha$  más comunes pueden activar esta vía de fosforilaciones ( $G_s$ ,  $G_q$ ,  $G_{i/o}$  y  $G_{12/13}$ ) (Sugden & Clerk, 1997; Liebmman, 2001). Se ha encontrado que la activación del MC4R, tanto la evocada por agonista (Daniels *et al.*, 2003; Vongs *et al.*, 2004; Berthoud *et al.*, 2006; Chai *et al.*, 2006) como la constitutiva (Mo & Tao, 2013) activan la vía de ERK1/2 a través de distintas proteínas G. En cuanto a la sensibilidad de los  $Ca_v$  a estas vías, trabajos previos mostraron que  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$  y  $Ca_v2.1$  son sensibles a la cascada de fosforilación de ERK1/2 (Morita *et al.*, 2004; Subramanian & Morozov, 2011). En principio, nosotros postulamos que la fosforilación de ERK1/2 por la actividad constitutiva del MC4R podría estar desencadenando vías de señalización que lleven a la fosforilación de los  $Ca_v$  (Sugden & Clerk, 1997), de manera que estén “marcados” para ser removidos de la membrana plasmática por ejemplo por ubiquitinación y posterior degradación en proteosoma (Altier *et al.*, 2011; Gandini *et al.*, 2014b) como mencionamos antes. Por otro lado, en el caso de la modulación del  $Ca_v2.2$  por la activación del MC4R evocada por agonista encontramos que la vía involucrada en la inhibición sería independiente de ERK1/2. Sin embargo, no descartamos que en nuestros ensayos se active también de manera aguda la fosforilación de ERK1/2, aunque este mecanismo sería innecesario para una vía paralela de señalización que inhibe los  $Ca_v2.2$ . Sobre esta última vía de señalización sabemos que es dependiente de  $G_s$  e independiente del voltaje aplicado (figuras 26 y 29) y además, que distintas isoformas de *splicing* alternativo no poseen sensibilidad diferencial a la misma (figuras 28). Una posibilidad es que PKA participe de esta vía, ya que muchos estudios demuestran que  $Ca_v2.2$  es sensible a la fosforilación por esta quinasa de manera dependiente de  $G_s$  e independiente del voltaje (Surmeier *et al.*, 1995; Kamaishi *et al.*, 2004; Kisilevsky *et al.*, 2008).

Nuestros resultados indican que la vía de señalización a través de  $G_{i/o}$  activada por la actividad constitutiva del MC4R y la cascada a través de  $G_s$  desencadenada por la activación del MC4R dependiente de agonista, funcionan de manera independiente una de otra. La utilización del mutante del MC4R, el MC4R-R18C, al carecer de actividad constitutiva a través de  $G_s$ , nos permitió verificar que en ausencia de esta cascada de

señalización, la vía a través de  $G_{i/o}$  se mantiene activada por la actividad constitutiva del MC4R, debido a que inhibe las  $I_{Ca}$  del  $Ca_v1.3$  (figura 30). A su vez, la incubación con PTx no eliminó la inhibición de las  $I_{Ca}$  del  $Ca_v2.2$  por la aplicación de MTII de células HEK293t expresando MC4R y  $Ca_v2.2$  (figura 33). Esta diferenciación e independencia de ambas vías de activación del MC4R permitiría un control fino de la actividad neuronal utilizando como blancos los distintos subtipos de  $Ca_v$ , ya que la llegada de  $\alpha$ -MSH influiría sólo en las corrientes  $Ca_v2.2$  en la pre-sinapsis, mientras que el nivel de expresión del MC4R y la llegada de AgRP a la neurona estarían modulando la actividad basal de los  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v1.3$  en la post-sinapsis, y la  $I_{Ca}$  de  $Ca_v2.1$  en la pre-sinapsis a través de mecanismos a largo plazo.

Si bien experimentos complementarios son necesarios para entender la implicancia fisiológica de estos mecanismos en el organismo, este trabajo de tesis aporta datos novedosos sobre un nuevo blanco de acción y sobre los mecanismos implicados en la actividad del MC4R a nivel celular y molecular, contribuyendo al ámbito científico con conocimientos que serán útiles para el desarrollo de estrategias farmacológicas basadas en la acción del MC4R relacionadas al tratamiento de la obesidad.

## Conclusiones

En este trabajo de tesis de doctorado presentamos la primera caracterización de la regulación de los  $\text{Ca}_v$  mediada por el MC4R. Los resultados obtenidos muestran una inhibición diferencial de los  $\text{Ca}_v$  por los dos modos de activación del MC4R. La actividad de MC4R dependiente de agonista inhibe los  $\text{Ca}_v2.2$  sin afectar al resto de los  $\text{Ca}_v$  estudiados, mientras que la actividad constitutiva del MC4R inhibe los  $\text{Ca}_v1.2$ ,  $\text{Ca}_v1.3$  y  $\text{Ca}_v2.1$  sin modificar la  $I_{\text{Ca}}$  del  $\text{Ca}_v2.2$ . Observamos estas inhibiciones en un sistema de expresión heteróloga donde tanto los  $\text{Ca}_v$  como el MC4R son sobre-expresados de manera aislada en un sistema de estudio controlado, y también en neuronas de amígdala en cultivo donde la expresión de los  $\text{Ca}_v$  y el MC4R está regulada por promotores nativos.

Encontramos que tanto las proteínas G como las cascadas intracelulares activadas difieren entre ambos mecanismos inhibitorios. La inhibición del  $\text{Ca}_v2.2$  por la actividad evocada por agonista del MC4R depende de la proteína  $G_s$ , en cambio, la actividad constitutiva que inhibe a los demás  $\text{Ca}_v$  es dependiente de  $G_{i/o}$  y totalmente independiente de  $G_s$ . Además, ambas vías de señalización son independientes entre sí. Vimos que la inhibición de los  $\text{Ca}_v2.2$  por la actividad de MC4R evocada por agonista depende de la concentración de MTII, es independiente del voltaje y de la fosforilación de ERK1/2. Por su parte, la inhibición de los  $\text{Ca}_v$  por la actividad constitutiva del MC4R depende de la cantidad de receptor expresado, involucra un mecanismo crónico y depende de la fosforilación de ERK1/2.

Encontramos también que la inhibición de  $\text{Ca}_v2.2$  por la activación aguda del MC4R es capaz de disminuir la liberación de GABA en neuronas en cultivo de amígdala y que este mecanismo podría ser importante en las interneuronas GABAérgicas que hacen sinapsis en la CeA. Además, vimos que al bloquear la actividad constitutiva del MC4R aumentaría la cantidad de  $\text{Ca}_v2.1$  en las terminales sinápticas de neuronas de amígdala en cultivo.

Postulamos que la actividad constitutiva del MC4R modula la disponibilidad de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  para activar la expresión génica frente a un estímulo debido a que la estimulación de los  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Ca}_v1.3$  con BayK, aumenta la proporción de células en las que se activa c-fos cuando la actividad constitutiva del MC4R se encuentra disminuida por AgRP.

A modo de resumen, nosotros encontramos que los  $\text{Ca}_v$  son sensibles a los distintos modos de activación del MC4R. Proponemos que este mecanismo contribuye a modular

la actividad neuronal, tanto a nivel pre-sináptico mediante el control de la liberación de NT, como post-sináptico a través de la modulación de la expresión génica.

## Bibliografía

- Abbott, C.R., Rossi, M., Kim, M., AlAhmed, S.H., Taylor, G.M., Ghatei, M.A., Smith, D.M. & Bloom, S.R. (2000) Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor. *Brain Res*, **869**, 203-210.
- Adan, R.A. (2006) Constitutive receptor activity series: endogenous inverse agonists and constitutive receptor activity in the melanocortin system. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 183-186.
- Adan, R.A. & Kas, M.J. (2003) Inverse agonism gains weight. *Trends Pharmacol Sci*, **24**, 315-321.
- Al-Barazanji, K.A., Miller, J.E., Rice, S.Q., Arch, J.R. & Chambers, J.K. (2001) C-terminal fragments of ACTH stimulate feeding in fasted rats. *Horm Metab Res*, **33**, 480-485.
- Alonso, N., Zappia, C.D., Cabrera, M., Davio, C.A., Shayo, C., Monczor, F. & Fernandez, N.C. (2015) Physiological implications of biased signaling at histamine H2 receptors. *Front Pharmacol*, **6**, 45.
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H.W., Hermosilla, T. & Zamponi, G.W. (2011) The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature neuroscience*, **14**, 173-180.
- Armstrong, D. & Eckert, R. (1987) Voltage-activated calcium channels that must be phosphorylated to respond to membrane depolarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2518-2522.
- Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C.Y., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J.K. & Lowell, B.B. (2005) Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, **123**, 493-505.
- Benoit, S.C., Schwartz, M.W., Lachey, J.L., Hagan, M.M., Rushing, P.A., Blake, K.A., Yagaloff, K.A., Kurylko, G., Franco, L., Danhoo, W. & Seeley, R.J. (2000) A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J Neurosci*, **20**, 3442-3448.
- Berecki, G., McArthur, J.R., Cuny, H., Clark, R.J. & Adams, D.J. (2014) Differential Cav2.1 and Cav2.3 channel inhibition by baclofen and alpha-conotoxin Vc1.1 via GABAB receptor activation. *J Gen Physiol*, **143**, 465-479.



- Berthoud, H.R., Sutton, G.M., Townsend, R.L., Patterson, L.M. & Zheng, H. (2006) Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav*, **89**, 517-524.
- Bezprozvanny, I., Scheller, R.H. & Tsien, R.W. (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature*, **378**, 623-626.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. & De Waard, M. (2000) The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*, **25**, 177-190.
- Boghossian, S., Park, M. & York, D.A. (2010) Melanocortin activity in the amygdala controls appetite for dietary fat. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **298**, R385-393.
- Bourinet, E., Stotz, S.C., Spaetgens, R.L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J. & Zamponi, G.W. (2001) Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of  $\alpha$ (1E) (Ca(V)2.3) calcium channels. *Biophys J*, **81**, 79-88.
- Bourinet, E., Zamponi, G.W., Stea, A., Soong, T.W., Lewis, B.A., Jones, L.P., Yue, D.T. & Snutch, T.P. (1996) The  $\alpha$  1E calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J Neurosci*, **16**, 4983-4993.
- Bowden, S.E., Fletcher, S., Loane, D.J. & Marrion, N.V. (2001) Somatic colocalization of rat SK1 and D class (Ca(v)1.2) L-type calcium channels in rat CA1 hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci*, **21**, RC175.
- Breit, A., Buch, T.R., Boekhoff, I., Solinski, H.J., Damm, E. & Gudermann, T. (2011) Alternative G protein coupling and biased agonism: new insights into melanocortin-4 receptor signalling. *Mol Cell Endocrinol*, **331**, 232-240.
- Brittain, J.M., Wang, Y., Wilson, S.M. & Khanna, R. (2012) Regulation of CREB signaling through L-type Ca<sup>2+</sup> channels by Nipsnap-2. *Channels (Austin)*, **6**, 94-102.
- Buch, T.R., Heling, D., Damm, E., Gudermann, T. & Breit, A. (2009) Pertussis toxin-sensitive signaling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines agouti-related protein as a biased agonist. *J Biol Chem*, **284**, 26411-26420.
- Burke, S.P., Adams, M.E. & Taylor, C.P. (1993) Inhibition of endogenous glutamate release from hippocampal tissue by Ca<sup>2+</sup> channel toxins. *Eur J Pharmacol*, **238**, 383-386.

- Cabral, A., Suescun, O., Zigman, J.M. & Perello, M. (2012) Ghrelin indirectly activates hypophysiotropic CRF neurons in rodents. *PloS one*, **7**, e31462.
- Caddick, S.J., Wang, C., Fletcher, C.F., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. & Hosford, D.A. (1999) Excitatory but not inhibitory synaptic transmission is reduced in lethargic (*Cacnb4(lh)*) and tottering (*Cacna1atg*) mouse thalami. *J Neurophysiol*, **81**, 2066-2074.
- Campiglio, M. & Flucher, B.E. (2015) The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J Cell Physiol*, **230**, 2019-2031.
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Hebllich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A. & Dolphin, A.C. (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of  $\alpha_2\delta$  subunits is key to trafficking voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 11230-11235.
- Carbone, E., Giancippoli, A., Marcantoni, A., Guido, D. & Carabelli, V. (2006) A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium*, **40**, 147-154.
- Catterall, W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 521-555.
- Colecraft, H.M., Alseikhan, B., Takahashi, S.X., Chaudhuri, D., Mittman, S., Yegnashbramanian, V., Alvania, R.S., Johns, D.C., Marban, E. & Yue, D.T. (2002) Novel functional properties of  $\text{Ca}^{2+}$  channel beta subunits revealed by their expression in adult rat heart cells. *J Physiol*, **541**, 435-452.
- Cone, R.D. (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*, **8**, 571-578.
- Cone, R.D. (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev*, **27**, 736-749.
- Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F. & Cone, R.D. (1999) Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*, **24**, 155-163.
- Cullinan, W.E., Ziegler, D.R. & Herman, J.P. (2008) Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. *Brain Struct Funct*, **213**, 63-72.

- Chai, B., Li, J.Y., Zhang, W., Newman, E., Ammori, J. & Mulholland, M.W. (2006) Melanocortin-4 receptor-mediated inhibition of apoptosis in immortalized hypothalamic neurons via mitogen-activated protein kinase. *Peptides*, **27**, 2846-2857.
- Chai, B.X., Neubig, R.R., Millhauser, G.L., Thompson, D.A., Jackson, P.J., Barsh, G.S., Dickinson, C.J., Li, J.Y., Lai, Y.M. & Gantz, I. (2003) Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides*, **24**, 603-609.
- Chaki, S. & Okuyama, S. (2005) Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides*, **26**, 1952-1964.
- Chang, F.H. & Bourne, H.R. (1989) Cholera toxin induces cAMP-independent degradation of Gs. *J Biol Chem*, **264**, 5352-5357.
- Chemin, J., Monteil, A., Briquaire, C., Richard, S., Perez-Reyes, E., Nargeot, J. & Lory, P. (2000) Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett*, **478**, 166-172.
- Christel, C. & Lee, A. (2012) Ca<sup>2+</sup>-dependent modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 1243-1252.
- Daniels, D., Patten, C.S., Roth, J.D., Yee, D.K. & Fluharty, S.J. (2003) Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus. *Brain Res*, **986**, 1-11.
- De Jongh, K.S., Warner, C. & Catterall, W.A. (1990) Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem*, **265**, 14738-14741.
- Deisseroth, K., Bito, H. & Tsien, R.W. (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, **16**, 89-101.
- Doering, C.J., Hamid, J., Simms, B., McRory, J.E. & Zamponi, G.W. (2005) Cav1.4 encodes a calcium channel with low open probability and unitary conductance. *Biophys J*, **89**, 3042-3048.
- Dolmetsch, R.E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J.M. & Greenberg, M.E. (2001) Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, **294**, 333-339.

- Dolphin, A.C. (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*, **35**, 599-620.
- Doroshenko, P.A., Woppmann, A., Miljanich, G. & Augustine, G.J. (1997) Pharmacologically distinct presynaptic calcium channels in cerebellar excitatory and inhibitory synapses. *Neuropharmacology*, **36**, 865-872.
- Dubel, S.J., Starr, T.V., Hell, J., Ahljanian, M.K., Enyeart, J.J., Catterall, W.A. & Snutch, T.P. (1992) Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5058-5062.
- Dunlap, K. & Fischbach, G.D. (1978) Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature*, **276**, 837-839.
- Dunlap, K. & Fischbach, G.D. (1981) Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol*, **317**, 519-535.
- Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., Jobst, E.E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S.K., Glavas, M.M., Grayson, B.E., Perello, M., Nilni, E.A., Grove, K.L. & Cowley, M.A. (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab*, **5**, 181-194.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. & Catterall, W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **25**, 533-535.
- Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M. & Campbell, K.P. (1997) Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha2delta subunit. *J Neurosci*, **17**, 6884-6891.
- Francois, A., Schuetter, N., Laffray, S., Sanguesa, J., Pizzoccaro, A., Dubel, S., Mantilleri, A., Nargeot, J., Noel, J., Wood, J.N., Moqrich, A., Pongs, O. & Bourinet, E. (2015) The Low-Threshold Calcium Channel Cav3.2 Determines Low-Threshold Mechanoreceptor Function. *Cell Rep*.
- Fu, L.Y. & van den Pol, A.N. (2008) Agouti-related peptide and MC3/4 receptor agonists both inhibit excitatory hypothalamic ventromedial nucleus neurons. *J Neurosci*, **28**, 5433-5449.

- Gandini, M.A., Henriquez, D.R., Grimaldo, L., Sandoval, A., Altier, C., Zamponi, G.W., Felix, R. & Gonzalez-Billault, C. (2014a) CaV2.2 channel cell surface expression is regulated by the light chain 1 (LC1) of the microtubule-associated protein B (MAP1B) via UBE2L3-mediated ubiquitination and degradation. *Pflugers Arch*, **466**, 2113-2126.
- Gandini, M.A., Sandoval, A., Gonzalez-Ramirez, R., Mori, Y., de Waard, M. & Felix, R. (2011) Functional coupling of Rab3-interacting molecule 1 (RIM1) and L-type Ca<sup>2+</sup> channels in insulin release. *J Biol Chem*, **286**, 15757-15765.
- Gandini, M.A., Sandoval, A., Zamponi, G.W. & Felix, R. (2014b) The MAP1B-LC1/UBE2L3 complex catalyzes degradation of cell surface CaV2.2 channels. *Channels*, **8**, 452-457.
- Gantz, I., Konda, Y., Tashiro, T., Shimoto, Y., Miwa, H., Munzert, G., Watson, S.J., DelValle, J. & Yamada, T. (1993) Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem*, **268**, 8246-8250.
- Gao, Z., Lei, D., Welch, J., Le, K., Lin, J., Leng, S. & Duhl, D. (2003) Agonist-dependent internalization of the human melanocortin-4 receptors in human embryonic kidney 293 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 870-877.
- Geisler, S., Schopf, C.L. & Obermair, G.J. (2015) Emerging evidence for specific neuronal functions of auxiliary calcium channel alpha(2)delta subunits. *Gen Physiol Biophys*, **34**, 105-118.
- Gelez, H., Poirier, S., Facchinetti, P., Allers, K.A., Wayman, C., Bernabe, J., Alexandre, L. & Giuliano, F. (2010) Neuroanatomical distribution of the melanocortin-4 receptors in male and female rodent brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, **40**, 310-324.
- Ghamari-Langroudi, M., Srisai, D. & Cone, R.D. (2011) Multinodal regulation of the arcuate/paraventricular nucleus circuit by leptin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 355-360.
- Ghamari-Langroudi, M., Vella, K.R., Srisai, D., Sugrue, M.L., Hollenberg, A.N. & Cone, R.D. (2010) Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol Endocrinol*, **24**, 2366-2381.
- Giancippoli, A., Novara, M., de Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E. & Carabelli, V. (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J*, **90**, 1830-1841.

- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L. & Dolmetsch, R. (2006) The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell*, **127**, 591-606.
- Gundersen, C.B. & Umbach, J.A. (2013) Synaptotagmins 1 and 2 as mediators of rapid exocytosis at nerve terminals: the dyad hypothesis. *J Theor Biol*, **332**, 149-160.
- Gurskaya, N.G., Staroverov, D.B., Zhang, L., Fradkov, A.F., Markina, N.M., Pereverzev, A.P. & Lukyanov, K.A. (2012) Analysis of alternative splicing of cassette exons at single-cell level using two fluorescent proteins. *Nucleic Acids Res*, **40**, e57.
- Hagan, M.M., Rushing, P.A., Pritchard, L.M., Schwartz, M.W., Strack, A.M., Van Der Ploeg, L.H., Woods, S.C. & Seeley, R.J. (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279**, R47-52.
- Hagiwara, S., Fukuda, J. & Eaton, D.C. (1974) Membrane currents carried by Ca, Sr, and Ba in barnacle muscle fiber during voltage clamp. *J Gen Physiol*, **63**, 564-578.
- Han, J., Mark, M.D., Li, X., Xie, M., Waka, S., Rettig, J. & Herlitze, S. (2006) RGS2 determines short-term synaptic plasticity in hippocampal neurons by regulating Gi/o-mediated inhibition of presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron*, **51**, 575-586.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanahan, D. & Meselson, M. (1983) Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*, **100**, 333-342.
- Haskell-Luevano, C., Chen, P., Li, C., Chang, K., Smith, M.S., Cameron, J.L. & Cone, R.D. (1999) Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology*, **140**, 1408-1415.
- Helton, T.D., Xu, W. & Lipscombe, D. (2005) Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly. *J Neurosci*, **25**, 10247-10251.
- Hell, J.W., Westenbroek, R.E., Warner, C., Ahljianian, M.K., Prystay, W., Gilbert, M.M., Snutch, T.P. & Catterall, W.A. (1993) Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol*, **123**, 949-962.

- Herlitze, S., Garcia, D.E., Mackie, K., Hille, B., Scheuer, T. & Catterall, W.A. (1996) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **380**, 258-262.
- Heximer, S.P., Watson, N., Linder, M.E., Blumer, K.J. & Hepler, J.R. (1997) RGS2/G0S8 is a selective inhibitor of Gqalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14389-14393.
- Hille, B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes.
- Ho, G. & MacKenzie, R.G. (1999) Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 35816-35822.
- Hulme, J.T., Konoki, K., Lin, T.W., Gritsenko, M.A., Camp, D.G., 2nd, Bigelow, D.J. & Catterall, W.A. (2005) Sites of proteolytic processing and noncovalent association of the distal C-terminal domain of CaV1.1 channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5274-5279.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P. & Lee, F. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, **88**, 131-141.
- Ikeda, S.R. (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, **380**, 255-258.
- Jarvis, S.E. & Zamponi, G.W. (2001) Distinct molecular determinants govern syntaxin 1A-mediated inactivation and G-protein inhibition of N-type calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **21**, 2939-2948.
- Jeong, S.W. & Ikeda, S.R. (2000) Endogenous regulator of G-protein signaling proteins modify N-type calcium channel modulation in rat sympathetic neurons. *J Neurosci*, **20**, 4489-4496.
- Jovanovic, T. & Ressler, K.J. (2010) How the neurocircuitry and genetics of fear inhibition may inform our understanding of PTSD. *Am J Psychiatry*, **167**, 648-662.
- Kaja, S., Van de Ven, R.C., Ferrari, M.D., Frants, R.R., Van den Maagdenberg, A.M. & Plomp, J.J. (2006) Compensatory contribution of Cav2.3 channels to acetylcholine release at the neuromuscular junction of tottering mice. *J Neurophysiol*, **95**, 2698-2704.



- Kamaishi, H., Endoh, T. & Suzuki, T. (2004) Multiple signal pathways coupling VIP and PACAP receptors to calcium channels in hamster submandibular ganglion neurons. *Auton Neurosci*, **111**, 15-26.
- Kammermeier, P.J., Ruiz-Velasco, V. & Ikeda, S.R. (2000) A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. *J Neurosci*, **20**, 5623-5629.
- Kask, A. & Schioth, H.B. (2000) Tonic inhibition of food intake during inactive phase is reversed by the injection of the melanocortin receptor antagonist into the paraventricular nucleus of the hypothalamus and central amygdala of the rat. *Brain Res*, **887**, 460-464.
- Katada, T., Bokoch, G.M., Northup, J.K., Ui, M. & Gilman, A.G. (1984) The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J Biol Chem*, **259**, 3568-3577.
- Katz, B. (1969) *The release of neural transmitter substances*. Liverpool University Press.
- Kehrl, J.H. & Sinnarajah, S. (2002) RGS2: a multifunctional regulator of G-protein signaling. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 432-438.
- Kim, C.S., Lee, S.H., Kim, R.Y., Kim, B.J., Li, S.Z., Lee, I.H., Lee, E.J., Lim, S.K., Bae, Y.S., Lee, W. & Baik, J.H. (2002) Identification of domains directing specificity of coupling to G-proteins for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *J Biol Chem*, **277**, 31310-31317.
- Kim, J.H., Mynatt, R.L., Moore, J.W., Woychik, R.P., Moustaid, N. & Zemel, M.B. (1996) The effects of calcium channel blockade on agouti-induced obesity. *FASEB J*, **10**, 1646-1652.
- King, B.M. (2006) Amygdaloid lesion-induced obesity: relation to sexual behavior, olfaction, and the ventromedial hypothalamus. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **291**, R1201-1214.
- Kishi, T., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Mountjoy, K.G., Saper, C.B. & Elmquist, J.K. (2003) Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, **457**, 213-235.
- Kisilevsky, A.E., Mulligan, S.J., Altier, C., Iftinca, M.C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B.A. & Zamponi, G.W. (2008) D1 receptors



- physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*, **58**, 557-570.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M. & Hofmann, F. (1999) Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunit. *J Neurosci*, **19**, 684-691.
- Lacinova, L. (2011) T-type calcium channel blockers - new and notable. *Gen Physiol Biophys*, **30**, 403-409.
- Lee, S.C., Choi, S., Lee, T., Kim, H.L., Chin, H. & Shin, H.S. (2002) Molecular basis of R-type calcium channels in central amygdala neurons of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3276-3281.
- Leenders, A.G., Hengst, P., Lopes da Silva, F.H. & Ghijsen, W.E. (2002) A biochemical approach to study sub-second endogenous release of diverse neurotransmitters from central nerve terminals. *J Neurosci Methods*, **113**, 27-36.
- Liebmann, C. (2001) Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. *Cell Signal*, **13**, 777-785.
- Lipscombe, D., Helton, T.D. & Xu, W. (2004) L-type calcium channels: the low down. *J Neurophysiol*, **92**, 2633-2641.
- Liu, H., Kishi, T., Roseberry, A.G., Cai, X., Lee, C.E., Montez, J.M., Friedman, J.M. & Elmquist, J.K. (2003) Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci*, **23**, 7143-7154.
- Liu, Y., Harding, M., Pittman, A., Dore, J., Striessnig, J., Rajadhyaksha, A. & Chen, X. (2014) Cav1.2 and Cav1.3 L-type calcium channels regulate dopaminergic firing activity in the mouse ventral tegmental area. *J Neurophysiol*, **112**, 1119-1130.
- Lopez Soto, E.J., Agosti, F., Cabral, A., Mustafa, E.R., Damonte, V.M., Gandini, M.A., Rodriguez, S., Castrogiovanni, D., Felix, R., Perello, M. & Raingo, J. (2015) Constitutive and ghrelin-dependent GHSR1a activation impairs CaV2.1 and CaV2.2 currents in hypothalamic neurons. *J Gen Physiol*, **146**, 205-219.
- Lopez Soto, E.J. & Raingo, J. (2012) A118G Mu Opioid Receptor polymorphism increases inhibitory effects on CaV2.2 channels. *Neuroscience letters*, **523**, 190-194.
- Lubrano-Berthelier, C., Durand, E., Dubern, B., Shapiro, A., Dazin, P., Weill, J., Ferron, C., Froguel, P. & Vaisse, C. (2003) Intracellular retention is a common characteristic of

- childhood obesity-associated MC4R mutations. *Human molecular genetics*, **12**, 145-153.
- M'Kadmi, C., Leyris, J.P., Onfroy, L., Gales, C., Sauliere, A., Gagne, D., Damian, M., Mary, S., Maingot, M., Denoyelle, S., Verdie, P., Fehrentz, J.A., Martinez, J., Baneres, J.L. & Marie, J. (2015) Agonism, Antagonism, and Inverse Agonism Bias at the Ghrelin Receptor Signaling. *J Biol Chem*, **290**, 27021-27039.
- Machado, I., Gonzalez, P., Schioth, H.B., Lasaga, M. & Scimonelli, T.N. (2010) alpha-Melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) reverses impairment of memory reconsolidation induced by interleukin-1 beta (IL-1 beta) hippocampal infusions. *Peptides*, **31**, 2141-2144.
- McKay, B.E., McRory, J.E., Molineux, M.L., Hamid, J., Snutch, T.P., Zamponi, G.W. & Turner, R.W. (2006) Ca(V)3 T-type calcium channel isoforms differentially distribute to somatic and dendritic compartments in rat central neurons. *The European journal of neuroscience*, **24**, 2581-2594.
- McMinn, J.E., Wilkinson, C.W., Havel, P.J., Woods, S.C. & Schwartz, M.W. (2000) Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279**, R695-703.
- Mesirca, P., Torrente, A.G. & Mangoni, M.E. (2015) Functional role of voltage gated Ca(2+) channels in heart automaticity. *Front Physiol*, **6**, 19.
- Mikkelsen, J.D., Bundzikova, J., Larsen, M.H., Hansen, H.H. & Kiss, A. (2008) GABA regulates the rat hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis via different GABA-A receptor alpha-subtypes. *Ann N Y Acad Sci*, **1148**, 384-392.
- Millington, G.W., Tung, Y.C., Hewson, A.K., O'Rahilly, S. & Dickson, S.L. (2001) Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat. *Neuroscience*, **108**, 437-445.
- Mo, X.L. & Tao, Y.X. (2013) Activation of MAPK by inverse agonists in six naturally occurring constitutively active mutant human melanocortin-4 receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1832**, 1939-1948.
- Molineux, M.L., McRory, J.E., McKay, B.E., Hamid, J., Mehaffey, W.H., Rehak, R., Snutch, T.P., Zamponi, G.W. & Turner, R.W. (2006) Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 5555-5560.

- Morgan, J.I. & Curran, T. (1986) Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*, **322**, 552-555.
- Morita, K., Miyasako, T., Kitayama, S. & Dohi, T. (2004) Interleukin-1 inhibits voltage-dependent P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel associated with the inhibition of the rise of intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration and catecholamine release in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*, **1673**, 160-169.
- Mountjoy, K.G. (2010) Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J*, **428**, 305-324.
- Mountjoy, K.G., Kong, P.L., Taylor, J.A., Willard, D.H. & Wilkison, W.O. (2001) Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiol Genomics*, **5**, 11-19.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B. & Cone, R.D. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol*, **8**, 1298-1308.
- Neugebauer, V. (2015) Amygdala pain mechanisms. *Handb Exp Pharmacol*, **227**, 261-284.
- Newman, E.A., Chai, B.X., Zhang, W., Li, J.Y., Ammori, J.B. & Mulholland, M.W. (2006) Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons. *J Surg Res*, **132**, 201-207.
- Nguyen, P.V., Abel, T. & Kandel, E.R. (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*, **265**, 1104-1107.
- Ou, L.C. & Gean, P.W. (2007) Transcriptional regulation of brain-derived neurotrophic factor in the amygdala during consolidation of fear memory. *Mol Pharmacol*, **72**, 350-358.
- Pare, D., Quirk, G.J. & Ledoux, J.E. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol*, **92**, 1-9.
- Perez-Reyes, E. (2003) Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev*, **83**, 117-161.

- Peterson, B.Z. & Catterall, W.A. (2006) Allosteric interactions required for high-affinity binding of dihydropyridine antagonists to Ca(V)1.1 Channels are modulated by calcium in the pore. *Mol Pharmacol*, **70**, 667-675.
- Potier, B., Dutar, P. & Lamour, Y. (1993) Different effects of omega-conotoxin GVIA at excitatory and inhibitory synapses in rat CA1 hippocampal neurons. *Brain Res*, **616**, 236-241.
- Raingo, J., Castiglioni, A.J. & Lipscombe, D. (2007) Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors. *Nat Neurosci*, **10**, 285-292.
- Raingo, J., Khvotchev, M., Liu, P., Darios, F., Li, Y.C., Ramirez, D.M., Adachi, M., Lemieux, P., Toth, K., Davletov, B. & Kavalali, E.T. (2012) VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission. *Nat Neurosci*, **15**, 738-745.
- Reid, C.A., Bekkers, J.M. & Clements, J.D. (2003) Presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci*, **26**, 683-687.
- Roberto, M., Madamba, S.G., Moore, S.D., Tallent, M.K. & Siggins, G.R. (2003) Ethanol increases GABAergic transmission at both pre- and postsynaptic sites in rat central amygdala neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2053-2058.
- Rosenmund, C. & Stevens, C.F. (1996) Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, **16**, 1197-1207.
- Roy, A.A., Baragli, A., Bernstein, L.S., Hepler, J.R., Hebert, T.E. & Chidiac, P. (2006) RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. *Cell Signal*, **18**, 336-348.
- Sabatini, B.L. & Regehr, W.G. (1999) Timing of synaptic transmission. *Annu Rev Physiol*, **61**, 521-542.
- Sah, P., Faber, E.S., Lopez De Armentia, M. & Power, J. (2003) The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*, **83**, 803-834.
- Sambrook, F.a.M. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*.
- Sambrook, J. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.

- Sandoval, A., Andrade, A., Beedle, A.M., Campbell, K.P. & Felix, R. (2007) Inhibition of recombinant N-type Ca(V) channels by the gamma 2 subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 3317-3327.
- Sather, W.A., Tanabe, T., Zhang, J.F., Mori, Y., Adams, M.E. & Tsien, R.W. (1993) Distinctive biophysical and pharmacological properties of class A (BI) calcium channel alpha 1 subunits. *Neuron*, **11**, 291-303.
- Scholze, A., Plant, T.D., Dolphin, A.C. & Nurnberg, B. (2001) Functional expression and characterization of a voltage-gated CaV1.3 (alpha1D) calcium channel subunit from an insulin-secreting cell line. *Mol Endocrinol*, **15**, 1211-1221.
- Sheng, Z.H., Yokoyama, C.T. & Catterall, W.A. (1997) Interaction of the synprint site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5405-5410.
- Shinyama, H., Masuzaki, H., Fang, H. & Flier, J.S. (2003) Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology*, **144**, 1301-1314.
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F. & Dascal, N. (1991) The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science*, **253**, 1553-1557.
- Srinivasan, S., Lubrano-Berthelier, C., Govaerts, C., Picard, F., Santiago, P., Conklin, B.R. & Vaisse, C. (2004) Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest*, **114**, 1158-1164.
- Stanley, E.F. (1993) Single calcium channels and acetylcholine release at a presynaptic nerve terminal. *Neuron*, **11**, 1007-1011.
- Subramanian, J. & Morozov, A. (2011) Erk1/2 inhibit synaptic vesicle exocytosis through L-type calcium channels. *J Neurosci*, **31**, 4755-4764.
- Sudhof, T.C. (2012) The presynaptic active zone. *Neuron*, **75**, 11-25.
- Sugden, P.H. & Clerk, A. (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*, **9**, 337-351.

- Suh, B.C., Kim, D.I., Falkenburger, B.H. & Hille, B. (2012) Membrane-localized beta-subunits alter the PIP2 regulation of high-voltage activated Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 3161-3166.
- Surmeier, D.J., Bargas, J., Hemmings, H.C., Jr., Nairn, A.C. & Greengard, P. (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron*, **14**, 385-397.
- Taylor, W.R. & Morgans, C. (1998) Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*. *Vis Neurosci*, **15**, 541-552.
- Thiele, T.E., van Dijk, G., Yagaloff, K.A., Fisher, S.L., Schwartz, M., Burn, P. & Seeley, R.J. (1998) Central infusion of melanocortin agonist MTII in rats: assessment of c-Fos expression and taste aversion. *Am J Physiol*, **274**, R248-254.
- Tranchand-Bunel, D., Delbende, C., Guy, J., Jegou, S., Jenks, B.J., Mocaer, E., Pelletier, G. & Vaudry, H. (1987) [Pro-opiomelanocortin neuronal systems]. *Rev Neurol (Paris)*, **143**, 471-489.
- Tuckwell, H.C. (2012) Quantitative aspects of L-type Ca<sup>2+</sup> currents. *Prog Neurobiol*, **96**, 1-31.
- Van der Ploeg, L.H., Martin, W.J., Howard, A.D., Nargund, R.P., Austin, C.P., Guan, X., Drisko, J., Cashen, D., Sebhat, I., Patchett, A.A., Figueroa, D.J., DiLella, A.G., Connolly, B.M., Weinberg, D.H., Tan, C.P., Palyha, O.C., Pong, S.S., MacNeil, T., Rosenblum, C., Vongs, A., Tang, R., Yu, H., Sailer, A.W., Fong, T.M., Huang, C., Tota, M.R., Chang, R.S., Stearns, R., Tamvakopoulos, C., Christ, G., Drazen, D.L., Spar, B.D., Nelson, R.J. & MacIntyre, D.E. (2002) A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11381-11386.
- Vongs, A., Lynn, N.M. & Rosenblum, C.I. (2004) Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regul Pept*, **120**, 113-118.
- Wan, S., Browning, K.N., Coleman, F.H., Sutton, G., Zheng, H., Butler, A., Berthoud, H.R. & Travagli, R.A. (2008) Presynaptic melanocortin-4 receptors on vagal afferent fibers modulate the excitability of rat nucleus tractus solitarius neurons. *J Neurosci*, **28**, 4957-4966.
- Wang, D., Papp, A.C., Binkley, P.F., Johnson, J.A. & Sadee, W. (2006) Highly variable mRNA expression and splicing of L-type voltage-dependent calcium channel alpha subunit 1C in human heart tissues. *Pharmacogenet Genomics*, **16**, 735-745.

- Weber, A.M., Wong, F.K., Tufford, A.R., Schlichter, L.C., Matveev, V. & Stanley, E.F. (2010) N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels carry the largest current: implications for nanodomains and transmitter release. *Nat Neurosci*, **13**, 1348-1350.
- Weiss, N., Hameed, S., Fernandez-Fernandez, J.M., Fablet, K., Karmazinova, M., Poillot, C., Proft, J., Chen, L., Bidaud, I., Monteil, A., Huc-Brandt, S., Lacinova, L., Lory, P., Zamponi, G.W. & De Waard, M. (2012) A  $\text{Ca(v)}3.2/\text{syntaxin-1A}$  signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J Biol Chem*, **287**, 2810-2818.
- Westenbroek, R.E., Ahljianian, M.K. & Catterall, W.A. (1990) Clustering of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. *Nature*, **347**, 281-284.
- Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Warner, C., Dubel, S.J., Snutch, T.P. & Catterall, W.A. (1992) Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel  $\alpha 1$  subunit. *Neuron*, **9**, 1099-1115.
- Westenbroek, R.E., Hoskins, L. & Catterall, W.A. (1998) Localization of  $\text{Ca}^{2+}$  channel subtypes on rat spinal motor neurons, interneurons, and nerve terminals. *J Neurosci*, **18**, 6319-6330.
- Westenbroek, R.E., Sakurai, T., Elliott, E.M., Hell, J.W., Starr, T.V., Snutch, T.P. & Catterall, W.A. (1995) Immunochemical identification and subcellular distribution of the  $\alpha 1A$  subunits of brain calcium channels. *J Neurosci*, **15**, 6403-6418.
- Wheeler, D.G., Barrett, C.F., Groth, R.D., Safa, P. & Tsien, R.W. (2008)  $\text{CaMKII}$  locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J Cell Biol*, **183**, 849-863.
- Xu, W. & Lipscombe, D. (2001) Neuronal  $\text{Ca(V)}1.3\alpha(1)$  L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci*, **21**, 5944-5951.
- Yamano, Y., Yoshioka, M., Toda, Y., Oshida, Y., Chaki, S., Hamamoto, K. & Morishima, I. (2004) Regulation of CRF, POMC and MC4R gene expression after electrical foot shock stress in the rat amygdala and hypothalamus. *J Vet Med Sci*, **66**, 1323-1327.
- Yeo, G.S., Lank, E.J., Farooqi, I.S., Keogh, J., Challis, B.G. & O'Rahilly, S. (2003) Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Human molecular genetics*, **12**, 561-574.

- Zhang, H., Fu, Y., Altier, C., Platzer, J., Surmeier, D.J. & Bezprozvanny, I. (2006) Ca<sub>v</sub>1.2 and Ca<sub>v</sub>1.3 neuronal L-type calcium channels: differential targeting and signaling to pCREB. *Eur J Neurosci*, **23**, 2297-2310.
- Zorrilla de San Martin, J., Pyott, S., Ballesteros, J. & Katz, E. (2010) Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels that support and modulate transmitter release at the olivocochlear efferent-inner hair cell synapse. *J Neurosci*, **30**, 12157-12167.